

# 2006 年度 修 士 論 文

内湾底質環境を反映する微生物群集と

その平面分布の把握

Analysis for Characteristic Microbial Community in Inner Bay  
Sediment and Their Distribution

新井 俊介

Arai, Shunsuke

東京大学大学院新領域創成科学研究科

環境学研究系 社会文化環境専攻

## 目次

<b>第 1 章</b>	<b>序論</b> .....	<b>1</b>
1.1	はじめに.....	1
1.2	研究の目的.....	1
1.3	本論文の構成.....	2
<b>第 2 章</b>	<b>既往の知見</b> .....	<b>3</b>
2.1	閉鎖性内湾底質における研究.....	3
2.2	閉鎖性内湾における底質の挙動.....	4
2.3	自然界における物質循環と微生物.....	5
<b>2.3.1</b>	真正細菌.....	5
<b>2.3.2</b>	アンモニア酸化細菌.....	6
<b>2.3.3</b>	嫌気性アンモニア酸化細菌.....	7
2.4	分子生物学的手法を用いた環境微生物群集解析.....	8
<b>2.4.1</b>	底質からの DNA 抽出.....	8
<b>2.4.2</b>	PCR (Polymerase Chain Reaction) 法.....	8
<b>2.4.3</b>	Cloning 法.....	9
<b>2.4.4</b>	Sequencing 法.....	9
<b>2.4.5</b>	T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length) 法.....	9
<b>第 3 章</b>	<b>実験の方法</b> .....	<b>10</b>
3.1	底質試料のサンプリング.....	10
<b>3.1.1</b>	東京湾 2005 年度サンプリング地点.....	11
<b>3.1.2</b>	有明海 2005 年度サンプリング地点.....	12
<b>3.1.3</b>	有明海 2006 年度サンプリング地点.....	13
<b>3.1.4</b>	底質サンプリングの方法.....	14
3.2	底質試料からの DNA 抽出.....	15
3.3	解析対象微生物と PCR primer および PCR 条件.....	16

<b>3.3.1</b>	真正細菌.....	16
<b>3.3.2</b>	アンモニア酸化細菌.....	17
<b>3.3.3</b>	嫌気性アンモニア酸化細菌.....	18
<b>3.4</b>	アガロースゲル電気泳動による PCR 産物の確認.....	19
<b>3.5</b>	PCR-Cloning-Sequencing 法.....	20
<b>3.6</b>	PCR-T-RFLP 法.....	22
<b>3.7</b>	水質測定.....	23

## **第 4 章 Cloning 法を用いた内湾底質中の微生物群集解析....24**

<b>4.1</b>	水質測定結果.....	25
<b>4.2</b>	真正細菌群集解析.....	26
<b>4.2.1</b>	東京湾の真正細菌群集解析結果.....	27
<b>4.2.2</b>	有明海の真正細菌群集解析結果.....	28
<b>4.2.3</b>	真正細菌群集解析の考察.....	29
<b>4.3</b>	アンモニア酸化細菌群集解析.....	30
<b>4.3.1</b>	東京湾のアンモニア酸化細菌群集解析結果.....	30
<b>4.3.2</b>	有明海のアンモニア酸化細菌群集解析結果.....	34
<b>4.3.3</b>	アンモニア酸化細菌群集解析の考察.....	37
<b>4.4</b>	嫌気性アンモニア酸化細菌群集解析.....	38
<b>4.4.1</b>	東京湾の嫌気性アンモニア酸化細菌群集解析 (Anammox).....	38
<b>4.4.2</b>	有明海の嫌気性アンモニア群集解析.....	41
<b>4.4.3</b>	嫌気性アンモニア酸化細菌群集解析の考察.....	44
<b>4.5</b>	まとめ.....	45

## **第 5 章 T-RFLP 法によるアンモニア酸化細菌群集解析の手法**

### **の確立 46**

<b>5.1</b>	検討方法.....	46
<b>5.1.1</b>	DNASIS による制限酵素および切断サイト検索.....	46
<b>5.1.2</b>	制限酵素処理の条件検討.....	48
<b>5.1.3</b>	実サンプルを用いた Cloning 法との比較.....	52
<b>5.2</b>	考察.....	54
<b>5.3</b>	まとめ.....	54

## **第 6 章 T-RFLP 法を用いた内湾底質のアンモニア酸化細菌**

## 群集解析 55

6.1	2005年度 東京湾 .....	56
6.2	2005年度 有明海 .....	58
6.3	2005年度サンプル解析の考察 .....	60
6.4	2006年度 有明海 .....	61
6.4.1	2006年9月サンプルのアンモニア細菌群集解析 .....	61
6.4.2	2006年12月サンプルのアンモニア細菌群集解析 .....	63
6.5	2006年度サンプル解析の考察 .....	65
6.6	まとめ.....	66

## 第7章 総括.....67

7.1	研究の成果 .....	67
7.2	今後の展望 .....	69

## 謝辞 70

## 参考文献 71

Fig. 2-1	The mechanism of Red tide and Blue tide .....	4
Fig. 2-2	The behavior of inner bay sediments .....	5
Fig. 2-3	The nitrogen cycle (by Brock Biology of Microorganisms) .....	7
Fig. 3-1	Sampling site in Tokyo bay(2005) .....	11
Fig. 3-2	Sampling site in Ariake Sea(2005) .....	12
Fig. 3-3	Sampling site in Ariake Sea(2006) .....	13
Fig. 3-4	Ekman-Birge bottom sampler .....	14
Fig. 3-5	Sediment Sampling.....	14
Fig. 3-6	Mobile instrument for measuring water quality .....	23
Fig. 4-1	Clone Library of Eubacteria in Tokyo bay(2005.10) .....	27
Fig. 4-2	Clone Library of Eubacteria in Ariake Sea(2005.10).....	28
Fig. 4-3	Phylogenetic Tree of AOB in Tokyo Bay(Neighbor-Joining method) .....	32
Fig. 4-4	Phylogenetic Tree of AOB in Ariake Sea(Neighbor-Joining method) .....	35
Fig. 4-5	Phylogenetic Tree of Anammox in Tokyo Bay(Neighbor-Joining method) .....	39
Fig. 4-6	Phylogenetic Tree of TB_AMX_Cluster-1(Neighbor-Joining method) ...	40
Fig. 4-7	Phylogenetic Tree of Anammox in Ariake Sea(Neighbor-Joining method) .....	42
Fig. 4-8	Phylogenetic Tree of AS_AMX_Cluster-1&2(Neighbor-Joining method)	43
Fig. 5-1	Result of exploratory experiment with BsaJ I .....	49
Fig. 5-2	Result of exploratory experiment with Hpy99 I ,Hpy188III and HpyCH4 IV.....	50
Fig. 5-3	Comparison of Cloning with T-RFLP in Tokyo Bay samples .....	53
Fig. 5-4	Comparison of Cloning with T-RFLP in Ariake Sea samples .....	53
Fig. 6-1	Temporal shift of AOB in Tokyo Bay (2005).....	57
Fig. 6-2	Temporal shift of AOB in Ariake Sea .....	59
Fig. 6-3	Distribution of AOB Community in Ariake Sea (2006.09) .....	62
Fig. 6-4	Distribution of AOB Community in Ariake Sea (2006.12) .....	64

Table. 2-1	Ammonia-oxidizing Reaction .....	6
Table. 2-2	Anammox Reaction .....	7
Table. 3-1	Oligonucleotide sequences of primers 27f and 1492r.....	16
Table. 3-2	PCR mixture for primers 27f and 1492r.....	16
Table. 3-3	PCR condition for primers 27f and 1492r.....	17
Table. 3-4	Oligonucleotide sequences of primers CTO189f and CTO654r .....	17
Table. 3-5	PCR mixture for primers CTO189f and CTO654r .....	17
Table. 3-6	PCR condition for primers CTO189f and CTO654r .....	18
Table. 3-7	Oligonucleotide sequences of primers Pla46f and Amx820r.....	18
Table. 3-8	PCR mixture for primers Pla46f and Amx820r.....	18
Table. 3-9	PCR condition for primers Pla46f and Amx820r.....	19
Table. 3-10	Composition of LB medium (300mL) .....	21
Table. 3-11	Colony Direct-PCR mixture for primers SP6-T7.....	21
Table. 3-12	Colony Direct-PCR condition for primers SP6-T7 .....	21
Table. 3-13	Oligonucleotide sequences of primers CTO189f and CTO654r for T-RFLP .....	22
Table. 3-14	Restriction Endonucleases for T-RFLP .....	22
Table. 4-1	Sampling Site and The Number of Clones (Tokyo bay) .....	24
Table. 4-2	Sampling Site and The Number of Clones (Ariake Sea) .....	24
Table. 4-3	Data of water quality in Tokyo bay (2005.10) .....	25
Table. 4-4	Data of water quality in Ariake Bay (2005.10).....	25
Table. 4-5	Composition of OTUs in Tokyo Bay .....	33
Table. 4-6	Composition of OTUs .....	36
Table. 5-1	Restriction Endonucleases and T-RFs for Tokyo Bay samples.....	47
Table. 5-2	Restriction Endonucleases and T-RFs for Ariake Sea samples .....	47
Table. 5-3	Reaction mixture with BsaJ I .....	51
Table. 5-4	Reaction Condition with BsaJ I .....	51
Table. 5-5	Reaction mixture with Hpy99 I , Hpy188III and HpyCH4IV .....	52
Table. 5-6	Reaction Condition with Hpy99 I , Hpy188III and HpyCH4IV .....	52
Table. 6-1	Data of water quality.....	59

# 第1章 序論

## 1.1 はじめに

近年、分子生物学的手法の発展に伴い、微生物を対象とした研究は飛躍的にその領域を広げた。その結果、培養困難な環境微生物についての研究も可能となり、以前に比べ簡便かつ迅速に微生物群集の様子を知ることができるようになった。微生物は底質・土壌をはじめとするあらゆる環境に存在し、分解者としての物質循環を通じ環境浄化を行っている。

現在、内湾などの閉鎖性水域では過剰な栄養塩類の流入により富栄養化が引き起こっている。特に、東京湾や有明海、大阪湾などは極めて多くに人口を支える社会的要因と、海水交換量が少ないといった地理的要因から富栄養化が著しく、赤潮の発生や、それに付随する貧酸素化が深刻な問題となっている。

内湾における底質は様々な機能を有していることが知られている。富栄養化に伴う海底付近での貧酸素化は底質中の有機物質が微生物によって分解される過程で酸素を消費することから生じている。その一方で、底質中に生息している微生物の中には水・底質環境から窒素成分を除去する機能を持つものがあるなど、底質は微生物の住処として内湾の水質浄化の一端を担っている。このように底質は内湾環境において極めて重要な要素であるにもかかわらず、その形成や輸送のメカニズムは未だに明らかになっていないというのが実情である。

内湾では潮汐や吹送流、エスチャリー循環などの作用により海水や底質の移動が生じている。特に底質中の粒径の小さなシルト状の泥は容易に巻き上げられ、栄養塩や微生物を伴って移動・堆積を繰り返していると考えられる。また、底質中の微生物は酸素の有無、栄養塩類濃度の違いなど、生息環境の影響を受け群集構造を変動させると共に、その底質が持つ硝化・脱窒などの機能や性質を反映していると予測される。

そこで本研究では、東京湾と有明海を対象内湾とし、底質における微生物群集解析を行うことで、微生物群集から見た底質の特徴付けが可能であり、群集構造の分布や変動を把握することで、底質の挙動や河川水流入の影響、さらには底質における水質浄化機能などを明らかにすることが出来るのではないかと考えた。

## 1.2 研究の目的

内湾底質環境は地点によって異なっており底質環境に影響をうける微生物群集を把握することができれば、微生物群集構造を、底質の挙動把握や水質浄化機能の解明においてなんらかの指標として用いることが出来るのではないだろうか。

そこで本研究では、底質と微生物の関係に着目し、微生物群集構造を通じて環境を把握することを目指した。

具体的には、

① 分子生物学的手法を用いた微生物群集解析によって内湾底質中の特徴的な微生物群集の把握

② それらの微生物群集の経時的变化および平面的分布を追跡

を行うことで、内湾底質中の微生物群集構造について新たな知見を得ることを目的とした。

### 1.3 本論文の構成

本論文は全 7 章から構成される。各章の概略と以下に示す。

#### 第 1 章 序論

本研究の背景と目的および論文の構成を述べた。

#### 第 2 章

本研究に関わる既往の研究報告などを簡潔にまとめた。

#### 第 3 章

本研究で行った実験方法について詳説した。

#### 第 4 章 Cloning 法を用いた内湾底質中の微生物群集解析

真正細菌，アンモニア酸化細菌，嫌気性アンモニア酸化細菌を対象とした微生物群集解析を行い、内湾底質中の微生物群集構造を明らかにした。

#### 第 5 章 T-RFLP 法を用いたアンモニア酸化細菌群集解析の手法の確立

第 4 章の結果をうけ、特徴的なアンモニア酸化細菌群集の挙動を追跡するための T-RFLP 法を確立した。

#### 第 6 章 T-RFLP 法を用いた内湾底質中のアンモニア酸化細菌群集解析

第 5 章で確立した手法を用いて、内湾底質中のアンモニア酸化細菌群集の季節変化と平面分布を明らかにした。

#### 第 7 章

本研究の成果についてまとめ、今後の展望を示した。



## 第2章 既往の知見

### 2.1 閉鎖性内湾底質における研究

現在、東京湾や有明海、大阪湾をはじめとする閉鎖性内湾では、我われの人間社会生活から排出される自然浄化能力を超えた環境負荷により水質・底質汚濁などの環境問題が引き起こされている。

そもそも閉鎖性水域とは、湖沼や内湾などの地形が閉鎖的で外部との水の出入りが緩やかであり水が域内に長く滞留する水域と指す。本研究での研究対象内湾である東京湾や有明海は、地形的にも陸地に入り組んでおり、かつ湾口が狭いということから海水交換量が少なく、窒素・リンなどの栄養塩類がある量以上流入すると富栄養化を引き起こしやすい形状になっている。富栄養化による赤潮・貧酸素水塊化・青潮の発生を以下にまとめる。

- ① 内湾への窒素・リンなどの大量流入 ⇒ 富栄養化
- ② 内湾の富栄養化
- ③ 植物プランクトンの異常発生 ⇒ 赤潮
- ④ 死滅による植物プランクトン(有機物質)の海底堆積
- ⑤ 好気性微生物による有機物質の生分解 ⇒ 貧酸素化
- ⑥ 嫌気性微生物による有機物質の生分解 ⇒ 硫化水素などの発生
- ⑦ 風応力などによる鉛直方向の海水混合
- ⑧ 貧酸素水塊の巻上げ ⇒ 青潮

特に、東京湾は夏場を中心に水温上昇による植物プランクトンの異常増殖と、さらに水温差による成層化が起こりやすく、海底付近では慢性的な貧酸素水化が生じている。

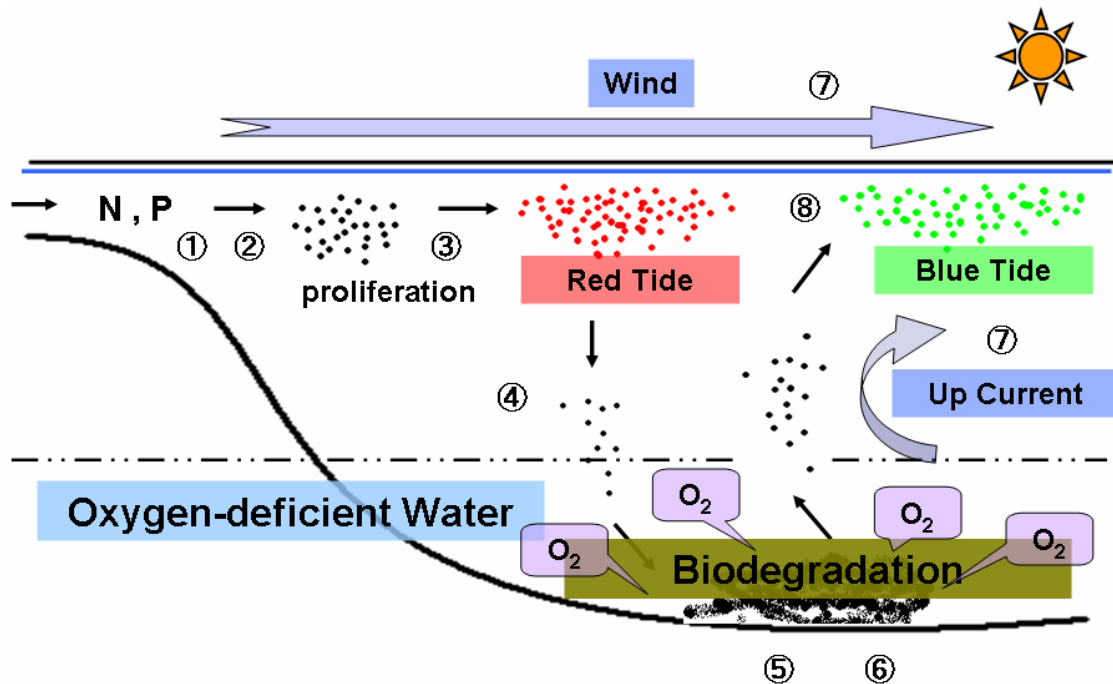


Fig. 2-1 The mechanism of Red tide and Blue tide

## 2.2 閉鎖性内湾における底質の挙動

河川から流入した淡水は海水と混合することにより凝集・沈殿作用を引き起こし有機物などの粒子が海底へと沈殿している。このような内湾域における細粒懸濁物の輸送は、底質や水質環境の形成に深く関係し、また、生物への栄養塩物質の供給にも関与するなど沿岸環境において重要な要素の一つである（中川ら,2002）。

内湾における水の流れは、潮汐による水位変動、海水面に作用する風応力（吹送流）、河川水などの淡水流入による塩分濃度および水温の勾配（エスチャリー循環）により引き起こる。この際、水の移動と共に底質も『巻き上げ⇒移動⇒堆積』を繰り返すと予測される。一方、微生物は内湾において底質中に生息し、様々な代謝を行っていると考えられ、底質と微生物は深い関連性をもつと予測される。したがって、底質が移動する際、様々な微生物が底質粒子に付帯しながら共に移動すると考えられる(Fig2-2)。

このような内湾底質の挙動を把握する試みは多く行われている。閉鎖性内湾における底泥の挙動に注目し、底泥の巻き上げ現象を解明使用と試みた（小蔵ら，1986）があるように1980年代から底泥は注目されていた。その多くは現地調査による海底部付近の流向・流速の測定と懸濁物質濃度の測定がほとんどであった。近年、キノプロファイルを用いた内湾の研究（鯉淵ら，2005）や有機炭素安定同位体比による底質中有機物質の分布（岡村ら，2005）を調べた報告がある。また、ダイオキシンをトレーサーとして東京湾の底泥

の移動傾向を調査する（加藤，2006）など底泥に代表される底質の挙動についてさまざまな指標を用いた研究や、水質・底質モデルの構築が内湾において行われている。しかしながら、現在、東京湾や有明海の底質挙動を的確に捉え評価する手法は報告されていない。

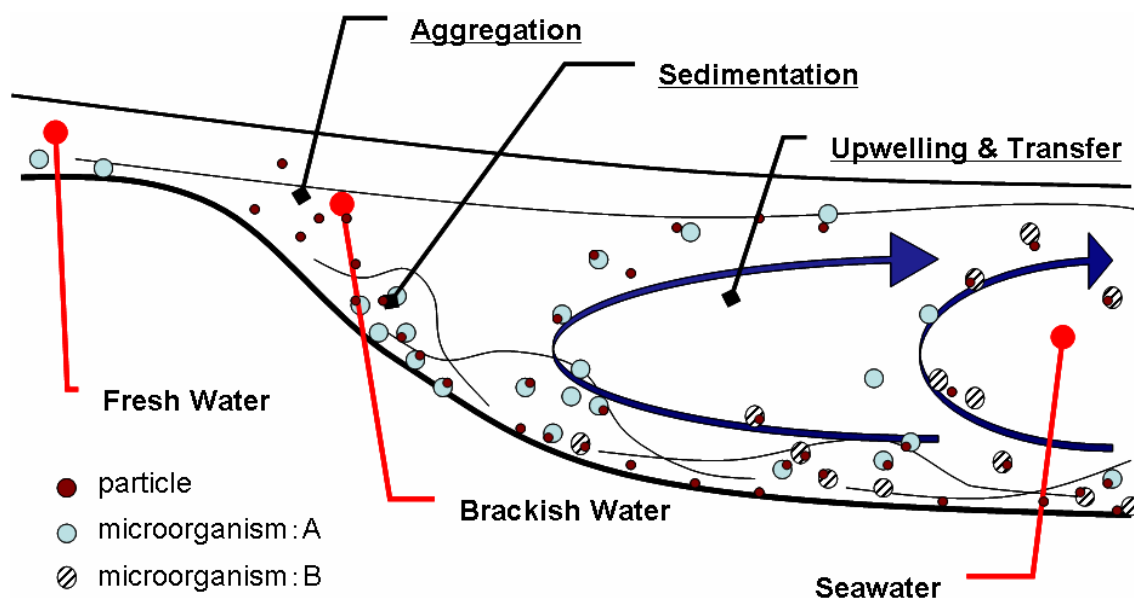


Fig. 2-2 The behavior of inner bay sediments

## 2.3 自然界における物質循環と微生物

本節では、本研究の解析対象である真正細菌，アンモニア酸化細菌，嫌気性アンモニア酸化細菌について、自然環境中での働きについて説明する。

### 2.3.1 真正細菌

生物の系統分類では、古細菌(Archea)、真正細菌 (Eubacteria)、真核生物 (Eukaryote) の 3 つに大きく分けられ、このうち古細菌と真正細菌を原核生物としている。真正細菌は古細菌と異なり、あらゆる自然界に生息できるように多様化した生物である。それゆえ地球上の多彩な物質を分解したり、空気中の炭素を固定したり、菌体外の高分子基質を分解する酵素たんぱく質を分泌したりと、様々な能力を持つ。本研究で解析対象としたアンモニア酸化細菌、嫌気性アンモニア酸化細菌、硫酸塩還元細菌はこの真正細菌に含まれ、真正細菌は系統分類的にも極めて幅広く進化したものといえる。

### 2.3.2 アンモニア酸化細菌

アンモニア酸化細菌は好気条件下でアンモニア態窒素を電子供与体、また酸素を電子受容体にした代謝を行っており、アンモニア態窒素を亜硝酸態窒素に酸化する機能をもつ。アンモニア酸化細菌は真正細菌に含まれる微生物であり、窒素循環を担っている。系統分類上ではβおよびγ-proteobacteria 網に属していることが知られている。β-proteobacteria 網には Nitrosomonas 属や Nitrospira 属が含まれており、一方、γ-proteobacteria 網には Nitrosococcus 属が含まれている。

地球上に存在する大気の主成分は窒素であり、その割合は約 78%になる。しかしながら窒素ガスそのものを代謝に利用できる生物は少なく、藍藻類や根粒菌などの一部の生物が無機態窒素を直接利用することができる。自然環境において大多数の微生物はそれらの生物が固定した窒素をアミノ酸態窒素、アンモニア態窒素、硝酸態窒素という形で間接的に利用している。自然環境へと放出されたアンモニア態窒素はアンモニア酸化細菌 (AOB) によって亜硝酸態窒素へ、さらに亜硝酸態窒素は亜硝酸酸化細菌 (NOB) によって最終的に硝酸態窒素まで酸化される。これら一連の働きを持つ細菌群を硝化細菌群とよぶ。さらに硝酸態窒素は原核生物などによって亜硝酸へと変換された後、脱窒細菌によって窒素ガスまで還元され、大気中へと放出される。アンモニア酸化細菌によるアンモニア態窒素の酸化反応を Table.2-1 に示す。

**Table. 2-1 Ammonia-oxidizing Reaction**

Step	Reaction
1	$\text{NH}_3 + \text{O}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}$
2	$\text{NH}_2\text{OH} + 2\text{H}_2\text{O} + 0.5\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2 + 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}^+$
Total	$\text{NH}_4^+ + 1.5\text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O} + 2\text{H}^+$

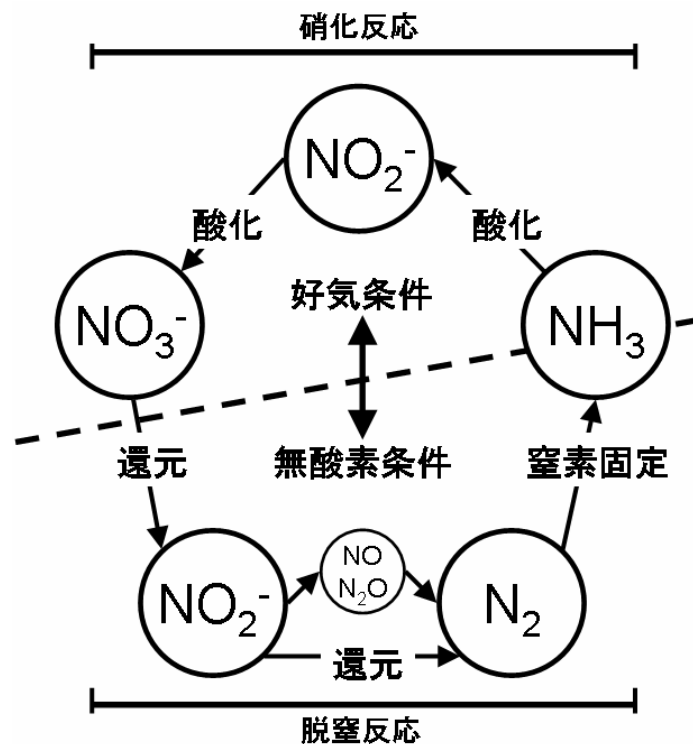


Fig. 2-3 The nitrogen cycle (by Brock Biology of Microorganisms)

### 2.3.3 嫌気性アンモニア酸化細菌

嫌気性アンモニア酸化細菌は真正細菌の中の Planctomyces 門に属している微生物であるが、培養困難であるため現在までに得られた知見はアンモニア酸化細菌などに比べると極めて少ないといえる。

アンモニア態窒素の酸化は好気条件下で行われると考えられてきたが、近年、嫌気条件下でアンモニア態窒素と亜硝酸態窒素を利用して窒素ガスまで還元する働きをもつ微生物群の存在が明らかになりつつある。これら嫌気性アンモニア酸化細菌 (Anammox) は、海洋底質などの自然環境中で窒素循環に貢献していると (Dalsgaard et al., 2005) という報告もあり、また、人間社会における下水処理の分野でも多大な注目を集めている。嫌気性アンモニア細菌による窒素の変換を下記に示す。

Table. 2-2 Anammox Reaction

Reaction
$\text{NH}_4^+ + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2 \uparrow + 2\text{H}_2\text{O}$

## 2.4 分子生物学的手法を用いた環境微生物群集解析

古典的な微生物学による環境微生物群集解析は、基本的に培養法に依存しており、微生物の生理学・生化学的性質を議論するうえで欠かせない手法である。しかしながら、自然界には培養困難な微生物が極めて多く存在し、複合微生物系において全ての微生物に適した培養条件を設定することが不可能であると指摘されることから、培養法による環境微生物群集解析には限界がある。

一方、1980年代以降、分子生物学的の発展と共に、環境中に存在する微生物由来の DNA や RNA に注目した解析手法が開発され、それまで解析対象とすることができなかった培養困難な微生物を検出・解析が可能となり、環境微生物学は飛躍的な進歩を遂げてきた。

本節では、本研究で用いた手法を中心に、分子生物学的手法による環境微生物解析法について概説する。

### 2.4.1 底質からの DNA 抽出

DNA 抽出は、分子生物学的手法を用いた解析の中でも最も基本的な操作である。DNA の抽出方法には、フェノールクロロホルム法、ベンジルクロライド法、各種 DNA 抽出キットによる方法などがあるが、本研究ではフェノールクロロホルム法も採用した ISOIL for Beads Beating (Nippon gene) を用いた。この DNA 抽出キットは界面活性剤による化学的に溶菌と Beads Beating による物理的な菌体破壊を併用しており、強固な細胞壁を持つ微生物からも DNA を抽出することが可能である。

### 2.4.2 PCR (Polymerase Chain Reaction) 法

PCR 法は微量な DNA の特定領域を各種解析手法による検出可能な濃度にまで増幅する手法であり、今日の遺伝子工学の発展に大きく寄与している。PCR 法には様々な変法が存在するが、ここでは最も基本的な PCR 法の原理について紹介する。

- ① 増幅元となる 2 本鎖 DNA (鋳型、テンプレート) を加熱し、変性(解離)させ、1 本鎖 DNA にする (denaturation)
  - ② 温度を下げ、増幅させたい特定部位の両端の DNA 塩基配列に相補的なプライマー (オリゴヌクレオチド短鎖) と鋳型 DNA を結合させる
  - ③ DNA 合成酵素 (DNA polymerase) と DNA 合成基質 (dNTP) により②の状態のプライマー結合部位から不足している DNA が合成され、標的にした DNA の完全な 2 本鎖が得られる (extension)
- ①-③の工程を 1 サイクルとし、これを  $n$  回繰り返すことにより、1 つの鋳型 2 本鎖 DNA から  $2^n$  の DNA 鎖を得ることができる

### **2.4.3 Cloning 法**

複合微生物系から、単一の DNA を抽出する方法のひとつに **Cloning** がある。Cloning により単離された DNA の塩基配列を解読することによって、複合微生物系から得られた DNA の集合体がどのような塩基配列種によって構成されているのかを解析することができる。本法は、環境微生物の DNA 配列情報の獲得に大きな貢献を果たしている。

PCR によって増幅された DNA (インサート) をベクターと呼ばれる環状 DNA に挿入 (ligation) させ、そのベクターを大腸菌などに組み込む (transformation) ことで、大腸菌の増殖と共にベクターおよび組み込まれた DNA が増幅されることになる。原理的に、1 つのベクターには 1 つのインサートが、さらに 1 つの大腸菌には 1 つのベクターが組み込まれることになるので、培養された大腸菌のコロニーひとつひとつが単独のインサートを持つことになる。

### **2.4.4 Sequencing 法**

シーケンシング (Sequencing) とは、塩基配列を解読し、決定することである。塩基配列を決定することにより、既知遺伝子との相同性検索や系統樹作成など、様々な解析および検討を行うことが可能となる。特に環境微生物群集解析においては、解析対象となる微生物群集を培養することなく、遺伝子上で解析するため塩基配列情報は極めて重要なものであるといえる。

### **2.4.5 T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length) 法**

蛍光標識された DNA 断片の集合体 (5'末端に蛍光標識したプライマーを用いた PCR 産物など) を、特定の塩基配列を認識して DNA 鎖を切断する制限酵素で処理し、蛍光色素が付加された側の断片長によって異なる塩基配列をもつ DNA 同士を分離する手法である。Liu et al.(1997)によって環境微生物の群集解析を目的として開発された。

## 第3章 実験の方法

本研究では、東京湾および有明海の底質において、真正細菌、アンモニア酸化細菌、嫌気性アンモニア細菌の群集解析を行った。これら 3 種類の細菌群集構造を把握するために PCR-Cloning-Sequencing 法 (Giovannnoni et al.,1990) を、さらにアンモニア酸化細菌群集の経時的挙動を明らかにするために PCR - T-RFLP 法(Moesender et al.,1999)を行った。以下にそれぞれの実験について示す。

### 3.1 底質試料のサンプリング

本研究では、東京湾および有明海より 2005 年から 2006 年にかけて底質サンプリングを行い、以後の解析対象サンプルとした。以下に東京湾および有明海のサンプリング地点とサンプリング方法について詳説する。



### 3.1.1 東京湾 2005 年度サンプリング地点

2005 年度に東京湾内 3 地点から 5 月 23 日, 7 月 13 日, 10 月 5 日の計 3 回にわたって底質を採取した。解析対象サンプルは底質の表層 3~5cm 部分とした。サンプリング地点を Fig.3-1 示す。

St.8 は湾中央部、St.98 は東京都側沿岸部、St.99 は千葉県側沿岸部に位置している。また、St.99 は浚渫溝である。

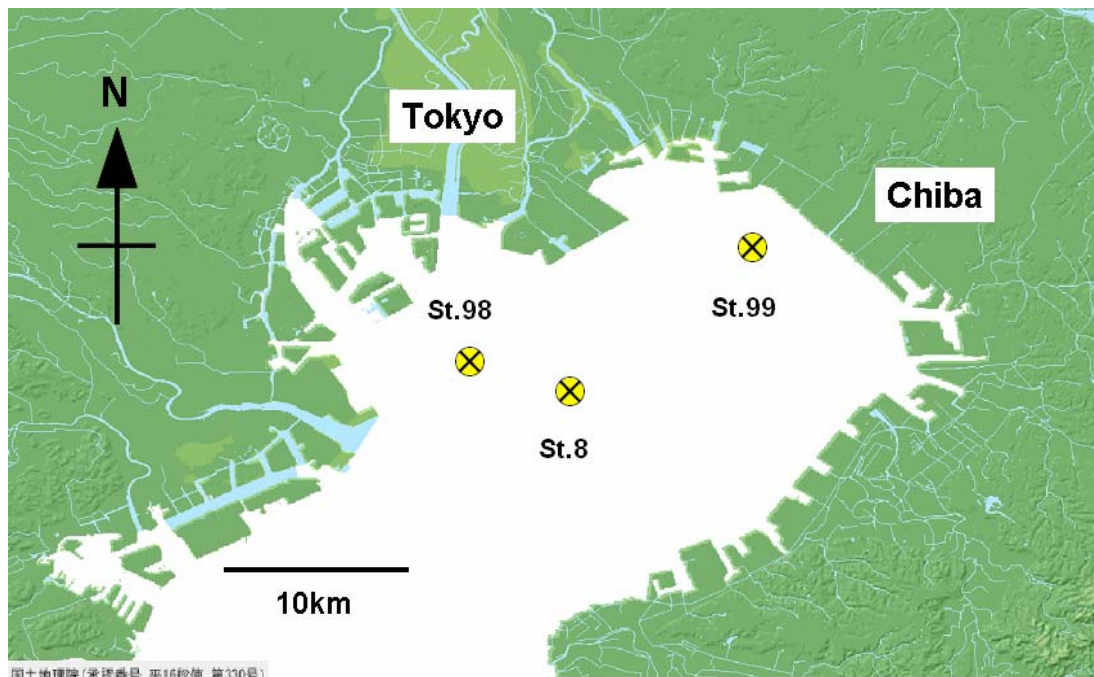


Fig. 3-1 Sampling site in Tokyo bay(2005)

### 3.1.2 有明海 2005 年度サンプリング地点

2005 年度に有明海の 3 地点より、7 月 20 日、8 月 23 日、10 月 12 日、12 月 7 日の計 4 回にわたって底質を採取した。解析対象サンプルは底質の表層 3~5cm 部分とした。サンプリング地点を Fig.3-2 に示す。S1 は諫早湾沖、S3 は筑後川河口付近、T1 は干潟に位置している。

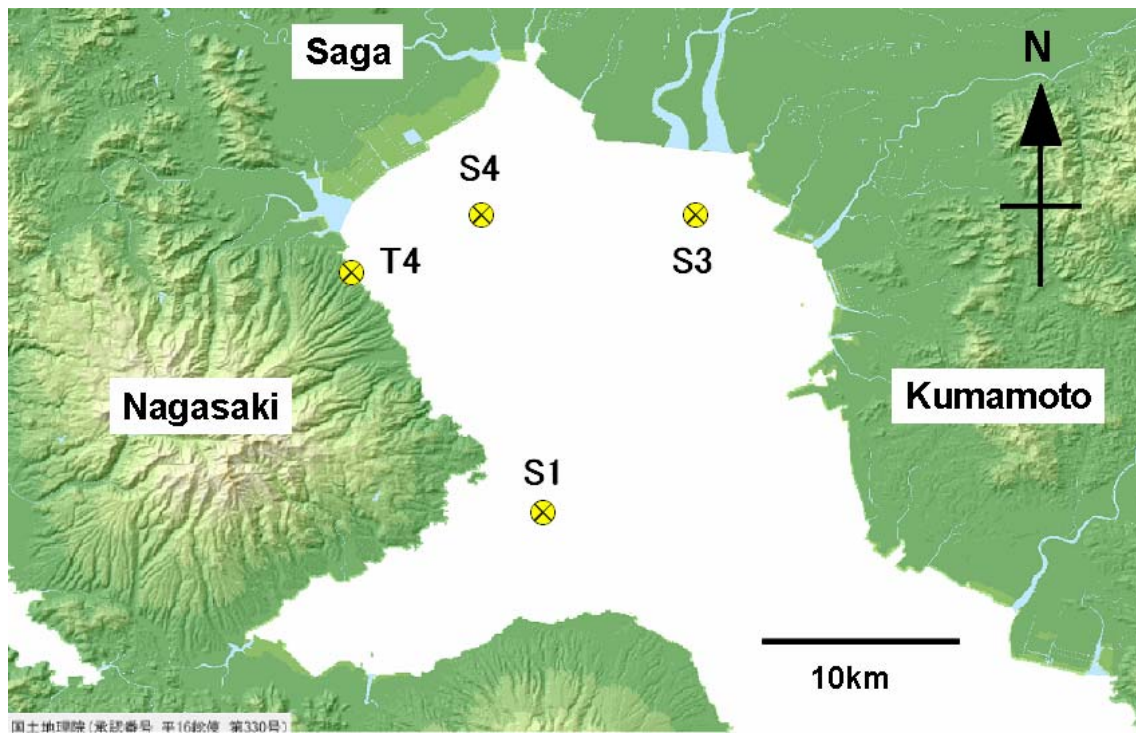


Fig. 3-2 Sampling site in Ariake Sea(2005)

### 3.1.3 有明海 2006 年度サンプリング地点

2006 年 9 月 26 日および 12 月 8 日の 2 回、有明海内 24 地点および有明海周辺河川や干潟を含む 7 地点の計 31 地点から底質の採取を行った。サンプリング地点を Fig.3-3 に示す。また、サンプリング地点のうち、St.1 は S1、St.17 は S3、T1 は干潟と同じ地点である。

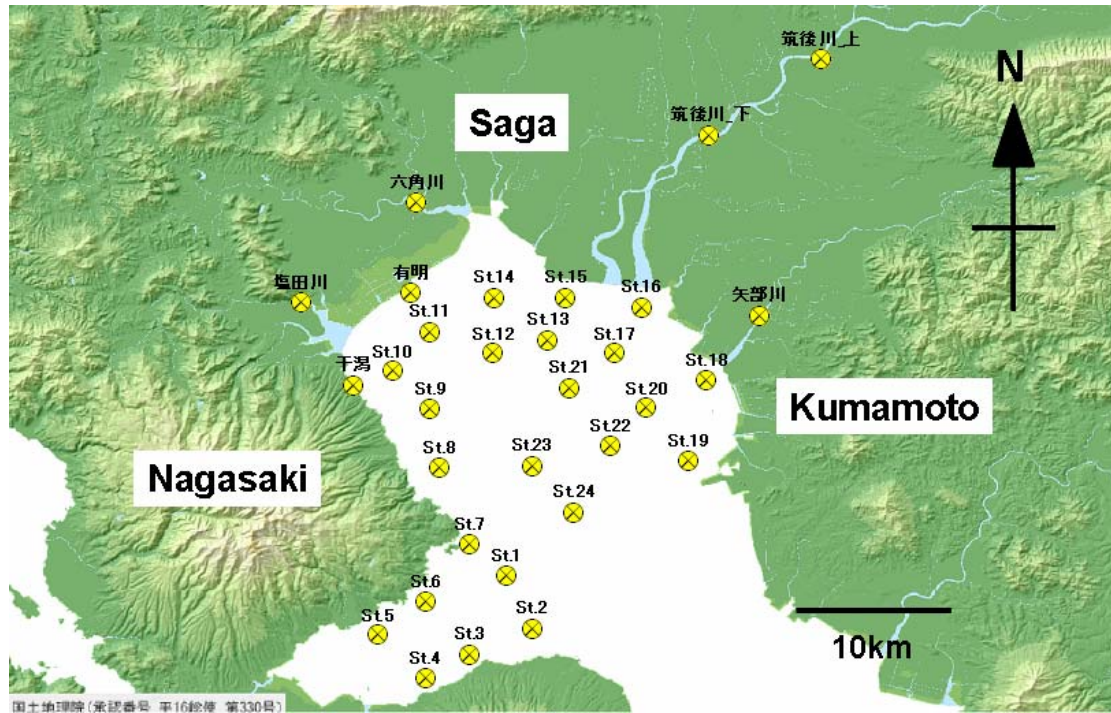


Fig. 3-3 Sampling site in Ariake Sea(2006)

### 3.1.4 底質サンプリングの方法

本研究では上記のサンプリング地点において、観測船上からエクマンバージ型採泥器(離合社)を用いて底質サンプルを採取した。サンプルは海底より引き上げられた底質コアの上部 3~5cm 部分を解析用サンプルとした。また、2006 年度有明海サンプリングでは、より細かい細菌群集構造の違いを明らかにするため、引き上げられた底質コアのから上部 1cm および 3cm の 2 層を別に採取し、以後の解析に供した。

また、採取した底質サンプルはプラスチック容器に入れ、解析に用いるまで $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

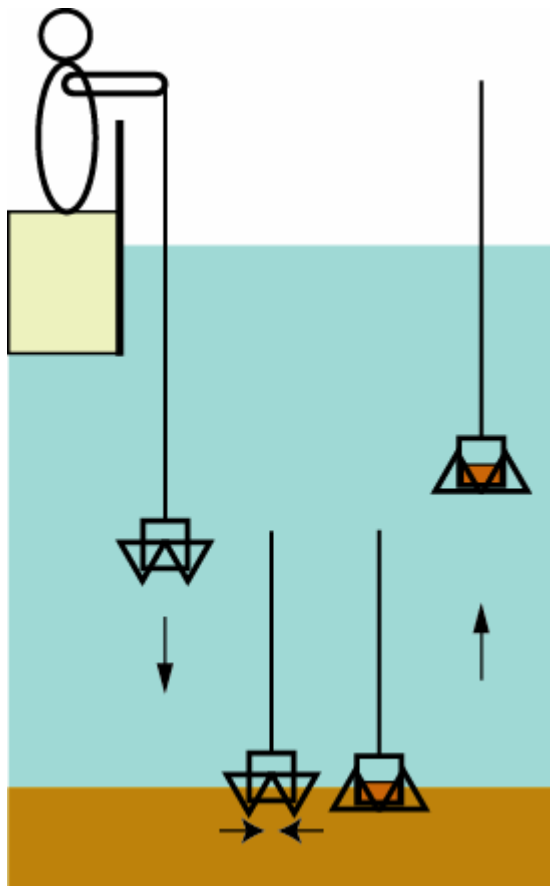


Fig. 3-4 Ekman-Birge bottom sampler



Fig. 3-5 Sediment Sampling

## 3.2 底質試料からの DNA 抽出

採取した底質サンプルからの DNA の抽出は ISOIL for Beads Beating(Nippon Gene)により行った。操作はキットに付属のプロトコルに従った。以下に手順を記す。

- ①  $-20^{\circ}\text{C}$  で凍結保存された内湾底質サンプルを解凍し、 $15000\text{g}$  で 10 分間遠心し、間隙水を取り除いた。
- ②  $0.5\text{g}$  程度を Beads Tube に量り入れた。
- ③  $950\mu\text{l}$  の Lydid Solution BB と  $50\mu\text{l}$  の Lysis Solution 20S を添加し、FastPrep Instrument(Qbiogene,現 MP Biomedicals)を用いて、speed5.5, 40sec で細胞破碎処理を行った。
- ④  $65^{\circ}\text{C}$  で 45 分間インキュベートした後、遠心分離 ( $12000\text{g}$ , 1 分間,  $20^{\circ}\text{C}$ ) を行った。
- ⑤ 上澄み液  $600\mu\text{l}$  を新しい  $2\text{ml}$  チューブに移し、 $400\mu\text{l}$  の Purification Solution を添加し、十分に転倒混和した。
- ⑥  $600\mu\text{l}$  のクロロホルムを添加し、15 秒間ボルテックスした後、遠心分離 ( $12000\text{g}$ , 15 分間,  $20^{\circ}\text{C}$ ) した。
- ⑦ 中間層を入れないように上部の上澄み液  $800\mu\text{l}$  を新しい  $2\text{ml}$  チューブに移し、 $800\mu\text{l}$  の Precipitation Solution を添加して十分に転倒混和し、遠心分離 ( $15000\text{g}$ , 15 分間,  $4^{\circ}\text{C}$ ) した。
- ⑧ マイクロピペットを用いて上澄み液を出来る限り捨て、Wash Solution を  $1\text{ml}$  加えて数回転倒混和し、遠心分離 ( $15000\text{g}$ , 10 分間,  $4^{\circ}\text{C}$ ) した。
- ⑨ 上澄み液を捨て、 $1\text{ml}$  の 70%エタノールと  $2\mu\text{l}$  の Ethachinmate を加えてボルテックスした後、遠心分離 ( $15000\text{g}$ , 5 分間,  $4^{\circ}\text{C}$ ) した。
- ⑩ 上澄み液を捨て、風乾した後、沈殿を  $100\mu\text{l}$  の TE (pH8.0) に溶解した。

上記の手順により得られた抽出 DNA 濃度を NanoDrop ND-1000 (NanoDrop) を用いて吸光度  $260\text{nm}$  の波長を測定することにより求めた。また、各サンプル DNA は解析に当たって濃度調整を行い  $10\text{ng}/\mu\text{l}$  となるようにした。

### 3.3 解析対象微生物と PCR primer および PCR 条件

本研究では、真正細菌，アンモニア酸化細菌，嫌気性アンモニア酸化細菌および硫酸塩還元細菌を標的にした PCR を行い、それぞれ増幅された DNA を以後の解析に用いた。ここでは各解析対象微生物について用いた PCR primer とその PCR 条件について詳説する。

#### 3.3.1 真正細菌

第 4 章において、各サンプリング地点の底質中にどのような微生物が存在しているのかを把握するために、硝化細菌や硫酸還元菌など多くの細菌群を含む真正細菌の群集解析を行った。その際、PCR primer set として 27f-1492r (Lane,1991) を用いた。本解析に使用した primer set の塩基配列およびその PCR 条件等を以下の表にまとめる。

**Table. 3-1 Oligonucleotide sequences of primers 27f and 1492r**

Primer	Sequences	Target	Reference
27f	aga gtt tga tcm tgg ctc ag	Eubacteria	Lane et al.,1991
1492r	tac ggy tac ctt gtt acg act t		

**Table. 3-2 PCR mixture for primers 27f and 1492r**

Component	Final conc.	Volume[ $\mu$ l]
ddH <sub>2</sub> O	—	70.5
10 × AmpliTaq PCR buffer(with 1.5mM MgCl <sub>2</sub> )	1×	10
2mM dNTP	0.2 mM	10
10 $\mu$ M forward primer	0.2 $\mu$ M	2
10 $\mu$ M reverse primer	0.2 $\mu$ M	2
5U/ $\mu$ l AmpliTaq Gold	2.5unit	0.5
Template DNA(10ng/ $\mu$ l)	50ng	5
total	—	100

**Table. 3-3 PCR condition for primers 27f and 1492r**

Step	Temperature[°C]	Duration[sec]	
Hot start	94	600	
Denature	94	30	25-30 cycles
Anneal	53	30	
Extension	72	90	
Final extension	72	600	

**3.3.2 アンモニア酸化細菌**

第4章および第6章において、各サンプリング地点の底質中に存在するAOBとその経時的変化を把握するためにCTO189f-CT654r (Kowalchuk,1997)を用いた細菌群集解析を行った。AOBの解析に使用したprimer setの塩基配列とそのPCR条件について以下にまとめる。ここで、CTO189A/BfとCTO189Cfは2:1で混合し実験に用いた。また、下記のPCR mixtureとPCR conditionはTawan(2004)を参考に若干の修正を加えた。

**Table. 3-4 Oligonucleotide sequences of primers CTO189f and CTO654r**

Primer	Sequences	Target	Reference
CTO189A/Bf	gga gra aag cag ggg atc g		
CTO189Cf	gga gga aag tag ggg atc g	$\beta$ - AOB	Kowalchuk et al.,1997
CTO654f	cta gcy ttg tag ttt caa acg c		

**Table. 3-5 PCR mixture for primers CTO189f and CTO654r**

Component	Final conc.	Volume[ $\mu$ l]
ddH2O	—	56.75
10 × AmpliTaq PCR buffer(with 1.5mM MgCl <sub>2</sub> )	1×	10
2mM dNTP	0.125 mM	6.25
10 $\mu$ M forward primer	1 $\mu$ M	10
10 $\mu$ M reverse primer	1 $\mu$ M	10
5U/ $\mu$ l AmpliTaq Gold	5unit	2
Template DNA(10ng/ $\mu$ l)	50ng	5
total	—	100

**Table. 3-6 PCR condition for primers CTO189f and CTO654r**

Step	Temperature[°C]	Duration[sec]	
Hot start	95	600	
	92	60	
Denature	92	30	30-35 cycles
Anneal	62-0.5/cycle	30	
Extension	72	45	
Final extension	72	300	

**3.3.3 嫌気性アンモニア酸化細菌**

第4章において、各サンプリング地点の底質中に存在する嫌気性アンモニア酸化細菌(Anammox)を把握するために下記の Pla46f-Amx820r の primer set を用いた細菌群集解析を行った。ただし Anammox の群集解析に用いた PCR primer set は Anammox のみに特異的なものではなく、Anammox 以外の Planctmyces を含むことに注意する必要がある。

**Table. 3-7 Oligonucleotide sequences of primers Pla46f and Amx820r**

Primer	Sequences	Target	Reference
Pla46f	gac ttg cat gcc taa tcc	Anammox of	Neef et al.,1998
Amx820r	aaa acc cct cta ctt agt gcc c	Planctmyces	Schmid et al.,2000

**Table. 3-8 PCR mixture for primers Pla46f and Amx820r**

Component	Final conc.	Volume[ $\mu$ l]
ddH <sub>2</sub> O	—	66.5
10 × AmpliTaq PCR buffer(with 1.5mM MgCl <sub>2</sub> )	1×	10
2mM dNTP	0.2 mM	10
10 $\mu$ M forward primer	0.4 $\mu$ M	4
10 $\mu$ M reverse primer	0.4 $\mu$ M	4
5U/ $\mu$ l AmpliTaq Gold	2.5unit	0.5
Template DNA(10ng/ $\mu$ l)	50ng	5
total	—	100



**Table. 3-9 PCR condition for primers Pla46f and Amx820r**

Step	Temperature[°C]	Duration[sec]	
Hot start	95	240	
Denature	95	60	35 cycles
Anneal	50	60	
Extension	72	90	
Final extension	72	240	

### 3.4 アガロースゲル電気泳動による PCR 産物の確認

PCR において、目的とする標的配列が正しく増幅されたかどうかを確認するためにアガロースゲル電気泳動を行った。アガロースゲルにアプライされた DNA 断片は、その長さによって異なる電気泳動距離を示すことが知られている。したがって、既知の DNA 断片長からなる DNA マーカーと共に PCR 産物を電気泳動することによって、PCR 産物が標的 DNA 断片長に等しいか、確認することができる。以下にアガロースゲル電気泳動の手順を記す。

- ① Agarose S(Nippon Gene)を 1×TAE に溶かし、1.0~2.0%(w/mL)アガロースゲルを作成した。
- ② Mupid-2plus(ADVANCE)にアガロースゲルをセットし、PCR 産物 5 $\mu$ l と 6×Loading Dye 1 $\mu$ l を混合したものをアガロースゲルのウェルにローディングした。また、DNA マーカーには DNA Ladder Markers, 100bp DNA Ladder(TOYOBO)を用いた。
- ③ 100V で 15~25 分間電気泳動した後、50,000 倍希釈したエチジウムブロマイド溶液 (BIO-RAD) で 15~25 分間染色した。
- ④ 染色が済んだアガロースゲルを FAS-III (TOYOBO) にセットし観察することで、目的の DNA 断片長の増幅確認を行った。

### 3.5 PCR—Cloning—Sequencing 法

3. 3 に示した実験条件で得られた PCR 産物を用いて PCR—Cloning—Sequencing 法により、東京湾および有明海の 2005 年 10 月に採取した底質サンプルに存在する、真正細菌、アンモニア酸化細菌、嫌気性アンモニア酸化細菌および硫酸塩還元細菌の塩基配列を決定した。以下に手順を記す。また、MEGA3.1 を用いて、得られた塩基配列よりそれぞれ系統樹を作成した。

#### ① PCR

解析対象サンプルとして、2005 年 10 月に採取した東京湾および有明海のそれぞれ 3 地点の底質から抽出した DNA を用いた。PCR mixture およびサイクル数以外のサーマルサイクラープログラムについてはは 3. 3 に従った。

#### ② PCR 産物のアガロース電気泳動

①より得られた PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、標的領域の増幅を確認した。このとき 1～2%のアガロースゲルを作成し、実験に用いた。

#### ③ PCR 産物の精製

②で標的領域の増幅が確認できた PCR 産物中に含まれる酵素反応阻害物質や未反応プライマーおよび dNTP を除去するために QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN)を用いて精製を行った。操作手順は『QIAquick PCR Purification kit プロトコール』にしたがった。

#### ④ Cloning

Cloning には QIAGEN PCR Cloning Kit(QIAGEN)を用い、操作手順は『QIAGEN PCR Cloning Handbook(April2001)』に従った。

また、Transformation 後の大腸菌株は LB 培地を用いて 37℃で 15 - 18 時間培養した。このとき、Blue-White selection を行うため、X-gal と IPTG を添加した培地を用いた。

#### ⑤ Sequencing

④により得られたクローンを用いてコロニーダイレクト PCR (Table. 3.3.4-) を行い、インサートが確認されたものを Sequencing に供した。また、Sequencing はタカラバイオ株式会社の受託サービス『大規模塩基配列解析』を利用した。

### タカラバイオ株式会社『大規模塩基配列解析』の内容

#### I. PCR 産物の精製

供与 PCR 産物について酵素反応処理により精製した。

## II. Sequencing 反応および精製

T7 など、各種プライマーを用いて Dye Terminator 法によりシーケンス反応を行った。また、シーケンス反応後の精製はゲルろ過法を用いた。

## III. Sequencing

シーケンスは 96well プレートフォーマットのキャピラリーシーケンサーABI3700 を用いて行った。

**Table. 3-10 Composition of LB medium (300mL)**

Component	Volume
ddH <sub>2</sub> O	300mL
LB Agar	12g
X-gal	0.6mL
Ampicillin	0.3mL
IPTG	0.15mL

**Table. 3-11 Colony Direct-PCR mixture for primers SP6-T7**

Component	Final conc.	Volume[ $\mu\ell$ ]
ddH <sub>2</sub> O	—	20.73
10 × AmpliTaq PCR buffer(with 1.5mM MgCl <sub>2</sub> )	1 ×	3
2mM dNTP	0.2 mM	3
10 $\mu$ M forward primer	0.2 $\mu$ M	0.06
10 $\mu$ M reverse primer	0.2 $\mu$ M	0.06
5U/ $\mu\ell$ AmpliTaq Gold	1.25unit	0.15
Template DNA(10ng/ $\mu\ell$ )	—	3
total	—	30

**Table. 3-12 Colony Direct-PCR condition for primers SP6-T7**

Step	Temperature[°C]	Duration[sec]
Hot start	95	600
Denature	94	30
Anneal	52	30
Extension	72	120
Final extension	72	600

### 3.6 PCR-T-RFLP 法

解析対象とした4細菌群集のうち、アンモニア酸化細菌に注目し、その経時的変化を明らかにするため、CTO189f - CTO654r の primer set のフォワード側に蛍光色素を付加させ、PCR-T-RFLP を行った。以下に手順を記す。また、ここでも CTO189a/bf と CTO189cf を 2 : 1 で混合し、実験に供した。

#### ① PCR

フォワードプライマーである CTO189f の 5'末端に蛍光色素 Fam を付加し (Table.3-16)、3. 3に準じて底質から抽出したすべてのサンプル DNA を用いて PCR を行った。

#### ② 制限酵素処理

3. 4のアンモニア酸化細菌を対象として行った実験結果より得られた塩基配列情報をもとに、特徴的な塩基配列を適切に処理できるよう、使用する制限酵素の選定を DNASIS pro(日立ソフトウェア)を用いて行った。制限酵素の検討については第5章で詳しく述べることとする。

#### ③ DNA 断片解析

制限酵素処理によって得られた DNA 断片の解析は、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(Applied Biosystems)の GeneScan モードにより行った。制限酵素処理の終わった PCR 産物を1本鎖 DNA にするため Hi-Di formamide で熱処理 (95°C, 2分間) し、その後すぐに5分間氷冷した。

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer の操作は付属マニュアルに従った。また、測定データの解析にはソフトウェア GeneMapper(Applied Biosystems)を使用した。

**Table. 3-13 Oligonucleotide sequences of primers CTO189f and CTO654r for T-RFLP**

Primer	Sequences	Target
CTO189A/Bf	5'-(6-Fam)gga gra aag cag ggg atc g -3'	
CTO189Cf	5'-(6-Fam)gga gga aag tag ggg atc g -3'	$\beta$ - AOB
CTO654f	cta gcy ttg tag ttt caa acg c	

**Table. 3-14 Restriction Endonucleases for T-RFLP**

	Target sample	Restriction site	Reaction Temp. [°C]	Inactivate Temp. [°C]	Conc. [units/ $\mu$ l]
BsaI	Tokyo Bay	C ! CNNGG	60	85	2.5
Hpy99 I	Ariake Sea	CGWCG !	37	65	2

Hpy188III	TC ! NNGA	37	65	5
HpyCH4IV	A ! CGT	37	65	10

### 3.7 水質測定

底質を採取する際、サンプリング地点の直上水質を投げ込み式水質測定器 (Fig.3-7) を用いて測定した。このときの測定項目は、水深、水温、塩分濃度、溶存酸素、pH、濁度である。



Fig. 3-6 Mobile instrument for measuring water quality

## 第4章 Cloning 法を用いた内湾底質中の微生物群集解析

本章では、第3章に述べた実験方法を用いて行った、Cloning 法を用いた内湾底質中の細菌群集解析の結果と考察についてまとめる。Sequencing 法より得られた塩基配列情報をもとに、BLAST による相同性検索や Mega3.1 を用いた系統樹作成を行った。なお、本研究では Sequencing の際、片側 DNA 断片のみの塩基配列を決定した。したがって系統樹作成の際、DNASIS (HITACHI) を用いて逆相補鎖を作成し、全塩基配列の向きを揃えた上で解析に供した。

第3章 3.3 に挙げた真正細菌、アンモニア酸化細菌、嫌気性アンモニア酸化細菌、硫酸塩還元細菌を解析対象微生物とし、2005 年 10 月に採取した底質サンプルを解析に供した。解析対象サンプルと解析から得られたクローン数を Table.4-1 にまとめる。

**Table. 4-1 Sampling Site and The Number of Clones (Tokyo bay)**

Sampling site	Number of clones		
	Eub	AOB	Anammox
St.8	96	45	13
St.98	95	44	36
St.99	94	41	27

**Table. 4-2 Sampling Site and The Number of Clones (Ariake Sea)**

Sampling site	Number of clones		
	Eub	AOB	Anammox
S1	93	44	27
S3	95	46	13
T1	94	45	22

#### 4.1 水質測定結果

2005年10月5日に東京湾の3地点から底質を採取した。また2005年10月15日に有明海の4地点から底質を採取した。各地点における底質直上水の水質測定結果を以下に示す。なお有明海の干潟に位置するT1については直上水質測定を行わなかった。

東京湾の底質直上水質はサンプリング地点がどこも水深15m以上であり、比較的似ているものであった。どこもDOが低く貧酸素化していることが観測された。しかしながらSt.99は水温、pH、濁度が低く、他の2地点と異なっていた。St.99は千葉県沿岸部に位置する浚渫により出来た人工的な窪みになっており、浚渫溝にある水塊は外部との交流が少ないことが知られている。海水は温度低下と共に海底へと沈むことから、他の2地点と比べ水温が2℃以上低い海水が浚渫溝に滞留しているのではないだろうか。このことが濁度およびpHの低さと関係しているのではないかと考えられる。また、St.99の塩分濃度が低いことも特徴的で、おそらく千葉県側からの河川水流入などが影響しているのではないかと考えられる。

有明海の3地点はどこも特徴的な場所である。S3は筑後川河口付近に位置していることから河川水流入の影響を大きく受けていることが予想される。またS4は干潟の近くに位置し、干潟の影響を少なからず受けていると考えられる。水質データを見てみると、水温、塩分濃度、pHに大きな差はない。その一方で、DOや特に濁度は地点ごとに異なっている。S3でDOが最も低くなるのは以外であるが、筑後川から流入した有機物質や栄養塩によってBODが高くなり、酸素消費が増加しているのかもしれない。しかしながらどの地点でも5mg/L以上のDOは存在しており、貧酸素化は引き起こっていなかった。また、濁度がS4で大きくなるのは前述したように干潟からの影響があると予測される。

**Table. 4-3 Data of water quality in Tokyo bay (2005.10)**

site	depth(m)	temperature(°C)	salinity(PSU)	DO(mg/L)	pH	turbidity
St.8	18.1	20.3	33.2	0	7.9	5.7
St.98	15.6	20.9	32.4	1.3	8.0	5.9
St.99	19.0	18.1	28.8	0.6	7.4	0.1

**Table. 4-4 Data of water quality in Ariake Bay (2005.10)**

site	depth(m)	temperature(°C)	salinity(PSU)	DO(mg/L)	pH	turbidity
S1	11.0	24.5	31.2	6.8	8.2	3.1
S3	3.3	24.5	29.7	5.3	8.1	22.2
S4	4.5	24.3	30.5	7.3	8.2	58.7

S4から採取した底質サンプルのCloning解析は行わなかった。

## 4.2 真正細菌群集解析

解析対象とした各地点の底質サンプル中に存在する微生物群集の全体像を把握するために 27f-1492r のプライマーセットを用いて真正細菌群集を標的とした解析を行った。

得られたクローンの塩基配列情報(約 600bps)を用いて BLAST による相同性検索を行い、各地点における真正細菌群集の構成を明らかにした。各地点における門レベルで整理したクローンライブラリーの構成を Fig.4-1 および 2 に示す。ただし、Proterobacteria 門に関しては綱レベルでまとめた。



#### 4.2.1 東京湾の真正細菌群集解析結果

St.8 から 96 クローン, St.98 から 95 クローン, St.99 から 94 クローンの塩基配列情報が得られ、相同性検索の結果、計 14 種類のグループに分けられた。どの地点においても Proteobacteria 門 (Alpha, Gamma, Delta, Epsilon-proteobacteria を含む) が多く検出され、その中でも特に、Delta-proteobacteria 綱と Epsilon-proteobacteria 綱が占める割合が、それぞれ 47~53%と大きくなっている。さらに、Delta-proteobacteria 綱には硫酸塩還元細菌が、また、Epsilon-proteobacteria 綱には硫黄酸化細菌に近縁なクローンが、Gamma-proteobacteria 綱には嫌気性硫黄酸化細菌に近縁なクローンが含まれていた。Fig.4-3 からわかるように、底質中の DO は極めて低く、嫌気的環境が生じていたと考えられる。さらに底質サンプルは 3 地点どこも黒色シルト状で硫黄成分を感じさせる独特のにおいを持っていた。つまりその底質の形状からも硫酸塩還元菌による反応が引き起こされており、それに伴う硫黄やチオ硫酸酸化細菌が存在していた考えることができる。また、東京湾では貧酸素化に伴う硫化水素の発生が問題になっており、硫酸塩還元菌の存在とその分布は極めて興味深い。

地点間の比較をしてみると、3 地点すべてから Actinobacteria 門, Bacteroidetes 門, Firmicutes 門, Proteobacteria 門等に近縁なクローンが検出されるなど、全体的に似た構成を持っていることがわかる。しかしながら、Cyanobacteria 門は 2 地点 (t.98 と St.99) から、Lentisphaerae 門 (St.99), Deinococcus-Thermus 門 (St.98), Spirochaetes 門 (St.99) はそれぞれ 1 地点からのみ検出された。こうしてみると、Cyanobacteria の検出有無によって湾中央部 (St.8) と湾奥沿岸部 (St.98 と St.99) に特徴付けられる。また、Lentisphaerae 門, Deinococcus-Thermus 門, Spirochaetes 門の検出有無によっても沿岸部間の東京都側と千葉県側で区別できる。これは St.99 の水質が他の 2 地点と少ないながらも異なっていたことと少なからず関係があると思われる。

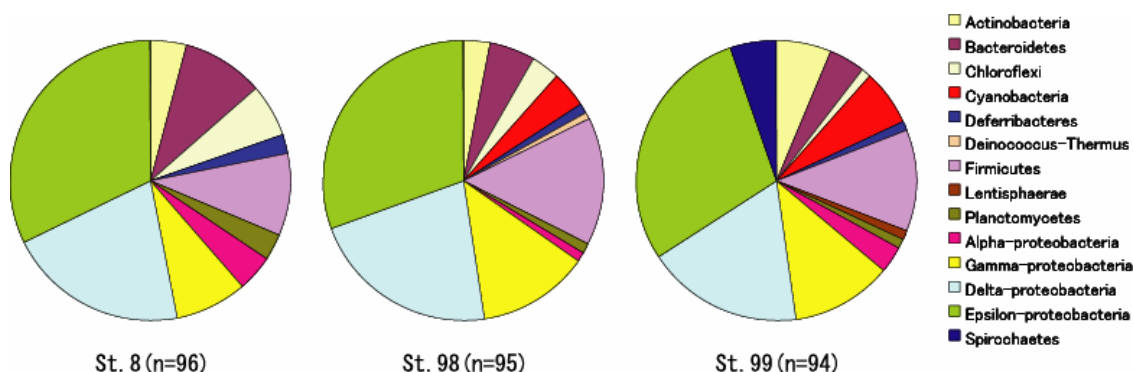


Fig. 4-1 Clone Library of Eubacteria in Tokyo bay(2005.10)

#### 4.2.2 有明海の真正細菌群集解析結果

S1 から 93 クローン, S3 から 95 クローン, T1 から 94 クローンの塩基配列情報が得られ、相同性検索の結果、計 15 種類のグループに分けられた。

各地点の構成を見てみると、S1 と T1 においては Proteobacteria 門 (Alpha, Beta, Gamma, Delta, Epsilon-proteobacteria を含む) に近縁なクローンが半数以上を占め、その他のグループの構成比も比較的似ているものの、S3 は Firmicutes 門が 68%以上を占めており、他の 2 点と明らかに異なる構成を有していた。S3 の Firmicutes 門の多くは Bacillales 綱に含まれるものであり、一般的にこれらの微生物群集は好気性細菌で様々な環境中に存在指定ことが知られている。したがってこの Bacillales 綱に近縁な微生物群集は好気性環境由来であることが考えられる。さらに S1 や T1 の海洋沿岸環境中からはここまで多く検出されていないことから筑後川の河川流入が影響を及ぼしているのではないかと推測される。

S1 および T1 では Proteobacteria 門の中でも特に Gamma および Delta-proteobacteria 綱に近縁なクローンが大半を占めるという点では共通していたが、T1 では Alpha-proteobacteria に近縁なクローンが比較的多く検出された。また、Aquificae 門と Nitrospirae 門は S1 からのみ、Cyanobacteria 門, Deferribacteres 門, Fusobacteria 門は T1 からのみ検出されるなど、地点間の細かな違いが観察された。

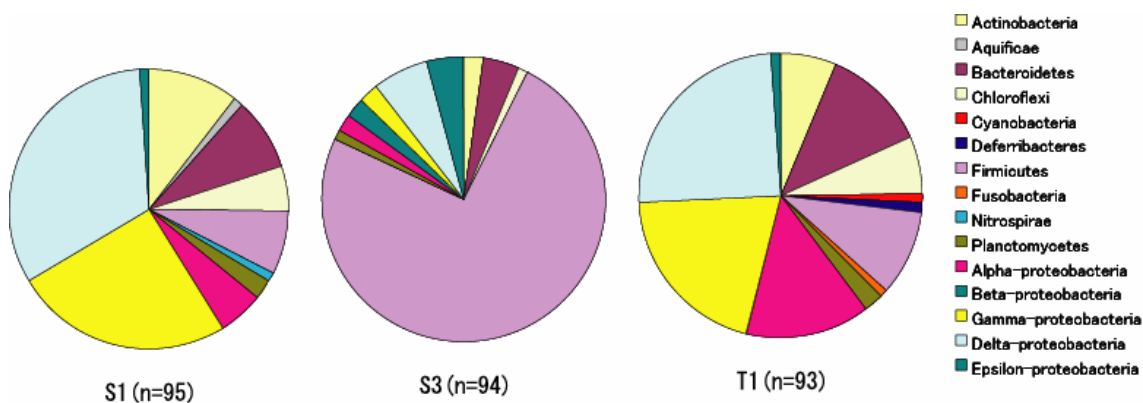


Fig. 4-2 Clone Library of Eubacteria in Ariake Sea(2005.10)

#### 4.2.3 真正細菌群集解析の考察

27f-1492r プライマーセットによる PCR-Cloning-Sequencing 解析を行った結果、東京湾および有明海のそれぞれ 3 地点における真正細菌群集の構造を把握することが出来た。

東京湾は解析対象サンプルの採取時、貧酸素化しており、3 地点の底質環境は嫌気状態に近かったと考えられる。3 地点全てから Delta および Epsilon-proteobacteria 綱に近縁なクローンが多く検出され、中でも Delta-proteobacteria 綱の多くは硫酸還元菌、Epsilon-proteobacteria 綱の多くは硫黄酸化細菌に近縁なクローンであった。硫酸塩還元菌は嫌気性細菌であり、東京湾の底質環境が嫌気下にあったことと一致する。また硫酸塩還元菌が還元する硫酸塩の生成には硫黄やチオ硫酸酸化細菌が関係しており、これらの細菌は好気性細菌であることから硫酸塩生成の際、酸素を利用することがわかっている。つまり硫黄酸化細菌やその他の好気性細菌によって底質付近の酸素が消費され、嫌気環境になったことで硫酸塩還元菌が活躍し始めたということが推測される。

また有明海においては筑後川河口付近である S3 で極めて特徴的な群集構造が示された。この地点で極めて多く検出された Firmicutes 門は筑後川からの淡水流入の影響を受けているものと考えられる。したがって筑後川河口から湾内に向かって、この微生物群集の分布と追跡することで河川水が湾内微生物群集に与える影響や、もしくは湾内の底質の挙動を把握できる可能性がある。

東京湾と有明海を比べたとき、真正細菌群集構造は明らかに異なっており、東京湾と有明海の底質環境の違いが明確に現れているといえる。同じ Proteobacteria 門が両内湾から検出されているものの、さらに細かく見たときに、Epsilon-proteobacteria 綱の割合は明らかに違っているうえ、Delta-proteobacteria 綱に含まれる硫酸塩還元菌も、その近縁種が異なっているなど内湾による違い把握することができた。

さらに東京湾および有明海の各サンプリング地点で真正細菌群集構造が細かく異なり、群集構造を通じてそれぞれの地点の特徴づけが可能であることも確認された。

### 4.3 アンモニア酸化細菌群集解析

解析対象とした各地点の底質中におけるアンモニア酸化細菌群集構造を明らかにするため、プライマーセット CTO189f-CTO654r を用いた群集解析を行った。

得られた塩基配列情報(450bps 前後)を用いて系統樹を Neighbor-Joining 法により作成した (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, ver.3.1 : MEGA3.1)。また、系統樹上で近縁であり、かつ、それらの塩基配列同士が 98%以上の相同性も持つものを一つにまとめ OTU(操作上の種単位)を作成した。東京湾で 3 つ、有明海で 6 つの OTU を作成した。以下に東京湾と有明海の系統樹を示し、OTU の構成を表にまとめる。

#### 4.3.1 東京湾のアンモニア酸化細菌群集解析結果

St.8 から 45 クローン、St.98 から 44 クローン、St.99 から 41 クローンの塩基配列情報が得られた。系統解析の結果、Nitrosomonas 属と Nitrospira 属の 2 グループが検出され、Nitrosomonas 属が全体の 95%以上を、さらに TB\_AOB\_OTU-1, 2 が全体の 88.7%を占めた。

TB\_AOB\_St.98-29, TB\_AOB\_St.99-30, TB\_AOB\_St.99-37 を除く Nitrosomonas 属は *Nitrosomonas sp. Nm143* Lineage(Koops et al.,2003)に分類され、TB\_AOB\_OTU-1 と TB\_AOB\_OTU-2 を含む多くのクローンは浦川ら(2005)によって東京湾底質から単離された *Nitrosomonas sp. NS20* に近縁な塩基配列を有していた。*Nitrosomonas sp. NS20* を含む *Nitrosomonas sp. Nm143* Lineage に属する単離株はすべて海域もしくは河口域から単離されており、海水域の特徴的な細菌群集であるといえる。

また、TB\_AOB\_OTU-3 を含む Nitrospira 属は *Nitrospira* Lineage(Koops et al.,2003)に分類されるものであり、St.8 からは検出されず陸域に近い St.98 と St.99 からのみ検出された。TB\_AOB\_OTU-3 に近縁であった *Nitrospira sp. Ka3* を含む *Nitrospira* Lineage の単離株はいずれも淡水や土壌などから単離されたものであり塩分耐性がなく (Aakra et al.,1999, Koops et al.,2003)、浦川らの研究においても東京湾沿岸側部 (St.98 の周辺) から検出されていない。しかしながら本実験においては千葉県側沿岸部の St.99 から *Nitrospira* Lineage に属するクローンが検出されており、St.99 は何らかの形で淡水の影響を受けているか、もしくは千葉県側から流入する河川水由来の細菌群集である可能性がある。

地点間の比較をしてみると、St.8 では TB\_AOB\_OTU-1 が多く、St.98 と St.99 では TB\_AOB\_OTU-2 が多く検出され、湾央部 (St.8) と湾奥沿岸部 (St.98, St.99) での違いが明らかになった。また、St.98 と St.99 では、少ないながらも TB\_AOB\_OTU-3 に差があり、湾奥沿岸部での違いも観察された。これらの違いは真正細菌群集解析の結果とも一致している。

以上より、東京湾の 3 地点におけるアンモニア酸化細菌群集その多くが Nitrosomonas

属であることから多様性は決して高くないことが明らかになった。その一方で、湾央部と湾奥沿岸部の違いや湾奥沿岸部における東京都側と千葉県側の違いなど、地点間の変動も把握することができた。

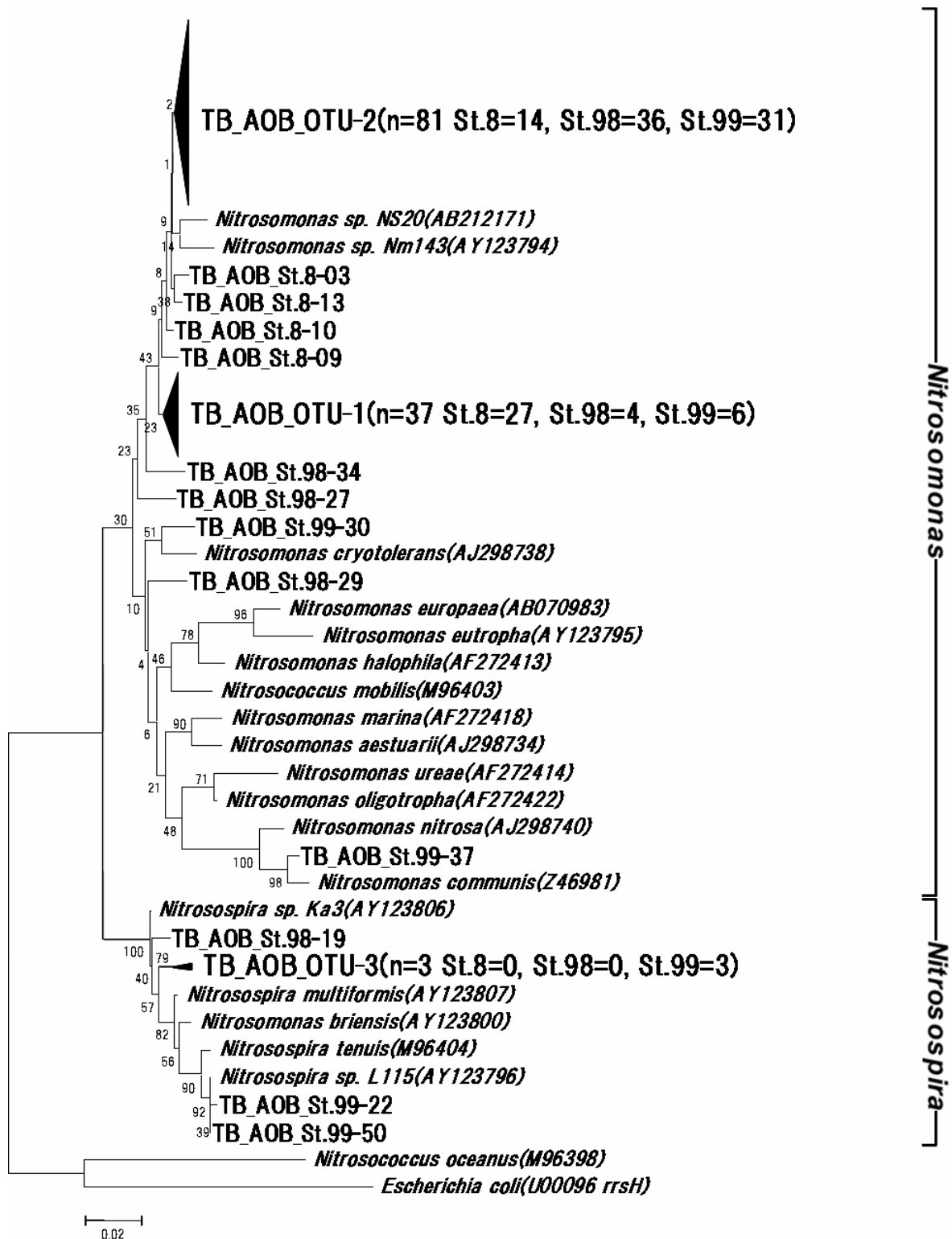


Fig. 4-3 Phylogenetic Tree of AOB in Tokyo Bay(Neighbor-Joining method)

約 446bps の塩基配列から作成した Beta-proteobacteria に含まれる AOB の系統樹。TB は Tokyo Bay の略称。

**Table. 4-5 Composition of OTUs in Tokyo Bay**

	St.8	St.98	St.99	Total	Related species
TB_OTU-1	27	4	6	37	<i>Nitrosomonas sp. NS20</i>
TB_OTU-2	14	36	31	81	<i>Nitrosomonas sp. NS20</i>
TB_OTU-3	0	0	3	3	<i>Nitrospira sp. Ka3</i>
others	4	4	4	12	—
Total	45	44	44	133	—

TB は Tokyo Bay の略称。また Related species は最も相同性の高い単離株。

#### 4.3.2 有明海のアンモニア酸化細菌群集解析結果

S1 から 44 クローン, S3 から 46 クローン, T1 から 45 クローンの塩基配列情報が得られた。系統解析の結果、東京湾同様、*Nitrosomonas* 属と *Nitrospira* 属の 2 グループが検出されたが、*Nitrospira* 属が 58%以上を占めており、その割合は東京湾と異なっていた。

各地点における OTU の構成を見てみると、AS\_AOB\_OTU-1 は S1 や T1 で多く検出され、AS\_AOB\_OTU-6 は T1 で多く検出された。また AS\_AOB\_OTU-2, 3, 4 は S3 のみで検出された。このように、OTU の構成は S1 と T1 が比較的似ているといえるが、S3 は AS\_AOB\_OTU-2, 3, 4 に代表されるように他の 2 地点と明らかに異なる構成を有していた。

AS\_AOB\_OTU-1 は *Nitrosococcus multiformis* に、AS\_AOB\_OTU-2 は *Nitrospira briensis* に、AS\_AOB\_OTU-3, 4 は *Nitrospira tenuis* にそれぞれ近縁であり、AS\_AOB\_OTU-1, 2, 3, 4 は共に *Nitrospira* Lineage に含まれた。前述したようにこれらの *Nitrospira* Lineage に含まれる単離株には塩分耐性がないことから、河川水流入などの淡水の影響を受けているものと考えられる。また、AS\_AOB\_OTU-5 と 6 は *Nitrosomonas sp. Nm143* Lineage に含まれ、*Nitrosomonas sp. NS20* に近縁であった。

東京湾底質においては *Nitrosomonas sp. Nm143* Lineage に含まれるクローンが極めて多く検出されたが、有明海においては占める割合が減少しており、内湾環境の違いが反映されたといえる。この他にも *Nitrosomonas aestuarii* や *Nitrospira sp. Ka3* に近縁なクローンが複数検出されるなど、東京湾に比べ、アンモニア酸化細菌群集の多様性が高いことが明らかになった。

これらの結果より、有明海における 3 地点のアンモニア酸化細菌群集は筑後川の淡水流入の影響を受けている S3 とそれ以外の 2 地点で異なることがわかった。特に S3 では AS\_AOB\_OTU-2, 3, 4 が特徴的であり、これらの群集は淡水の影響を反映していると考えられる。さらに東京湾ではほとんど検出されなかった塩分耐性を持たないとされる *Nitrospira* Lineage がどの地点においても多く検出されているということは、有明海内の海水移動や底質輸送が頻繁に行われており、微生物も底質と共に移動していると考えられることができる。



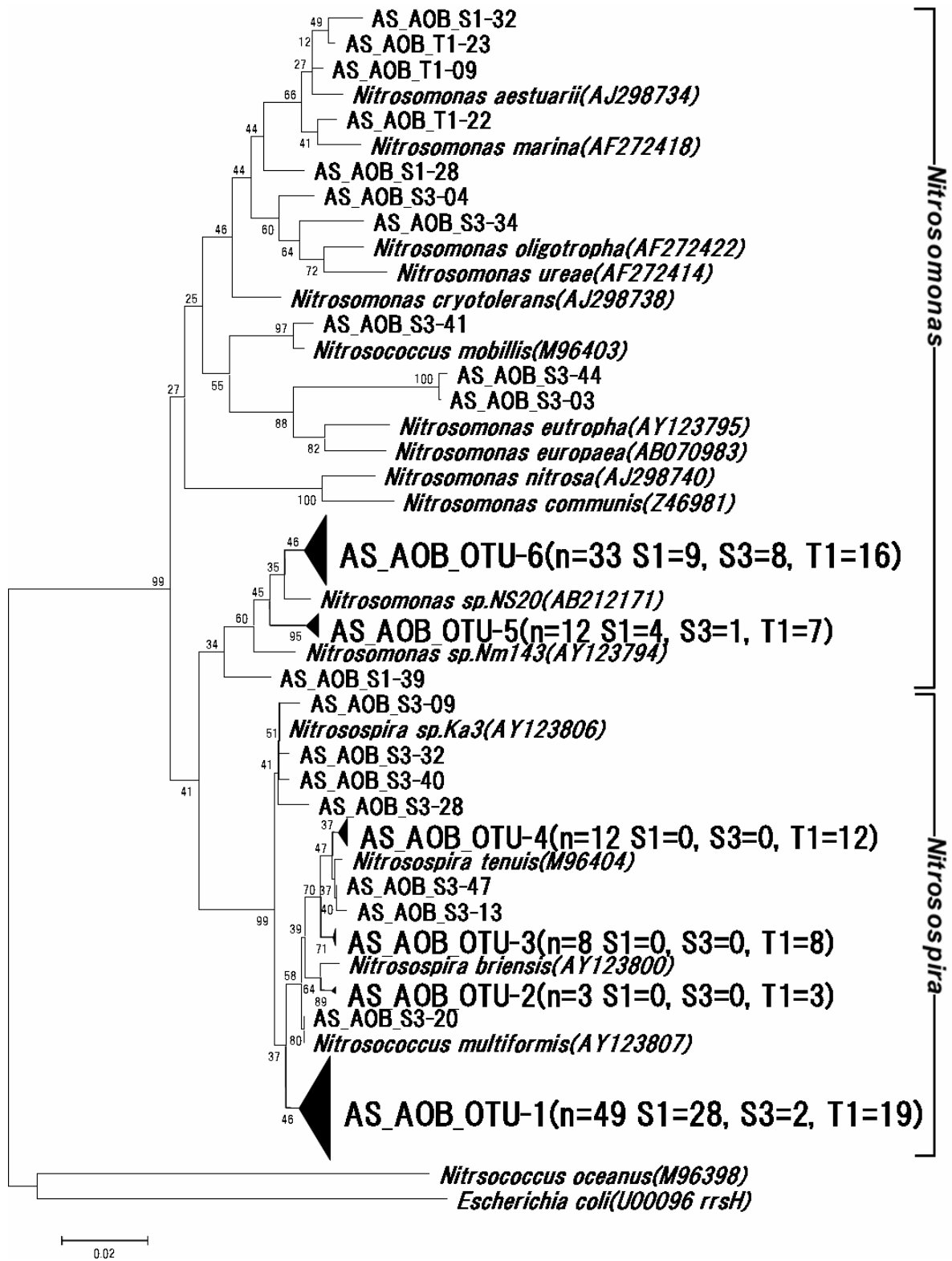


Fig. 4-4 Phylogenetic Tree of AOB in Ariake Sea (Neighbor-Joining method)

約 450bps の塩基配列から作成した Beta-proteobacteria に含まれる AOB の系統樹。AS は Ariake Sea の略称。

**Table. 4-6 Composition of OTUs**

	S1	S3	T1	Total	Related species
AS_OTU-1	28	2	19	49	<i>Nitrospira multiformis</i>
AS_OTU-2	0	3	0	3	<i>Nitrospira briensis</i>
AS_OTU-3	0	8	0	8	<i>Nitrospira tenuis</i>
AS_OTU-4	0	12	0	12	<i>Nitrospira tenuis</i>
AS_OTU-5	4	1	7	12	<i>Nitrosomonas sp. NS20</i>
AS_OTU-6	9	8	16	33	<i>Nitrosomonas sp. NS20</i>
others	3	12	3	18	—
Total	44	46	45	135	—

AS は Ariake Sea の略称。Related species は最も相同性の高い単離株。

#### 4.3.3 アンモニア酸化細菌群集解析の考察

CTO189f-CTO654r プライマーセットを用いた PCR-Cloning-Sequencing 法によるアンモニア酸化細菌群集解析を行った結果、東京湾および有明海のそれぞれ 3 地点におけるアンモニア酸化細菌群集構造を明らかにすることが出来た。

東京湾では *Nitrosomonas* 属の *Nitrosomonas sp. Nm143* Lineage に含まれるクローンが大多数を占め、この中でも特に、東京湾底質から浦川らによって単離された *Nitrosomonas sp. NS20* に近縁なクローンが 3 地点それぞれから多く検出された。このことは東京湾底質におけるアンモニア酸化細菌群集の多様性が低いことを示しており、底質サンプリング時の地点でも貧酸素化が生じていたように、水質・底質環境の地点間変動が少ないと考えられる。またアンモニア酸化細菌は好気性細菌であるものの無酸素環境でもある程度生存可能であるとされているが、東京湾のような夏場を中心に慢性的に貧酸素化している環境であり、そのことがアンモニア酸化細菌群集の低い多様性に関連している可能性がある。その一方で、少ないながらも千葉県沖の St.99 を中心に塩分耐性を持たないとされる *Nitrospira* Lineage に含まれるクローンが検出されており、少ないながらも河川水流入などの淡水影響を受けていると予測される。地点間の群集構造の違いは OTU の構成から読み取れるように、真正細菌群集の解析結果同様、湾央部 (St.8) と湾奥沿岸部 (St.98, St.99) で異なり、さらに湾奥沿岸部においても東京都側沿岸部 (St.98) と千葉県側沿岸部 (St.99) で区別される。

有明海底質においては、東京湾に比べ、淡水の影響を受けているであろう *Nitrospira* Lineage に属するクローンが多数検出された。特に AS\_AOB\_OTU-1, 2, 3, 4 は S3 の特徴的な細菌群集であり、他の 2 地点からはこの OTU に含まれるクローンが検出されなかった。また、同じく塩分耐性を持たないとされる *Nitrospira* Lineage に含まれる AS\_AOB\_OTU-1 がどの地点からも検出されている。有明海は東京湾に比べて河川水流入の影響を受けやすく、つまり海水や底質の移動が頻繁であると考えられる。事実、有明海は潮汐による水位変動が大きいことで知られており、また浮泥などの懸濁物質が多いことから、それに伴い微生物群集が移動してのではないかと推測される。

有明海はその地理的要因から干拓が多く行われており、諫早湾の締め切り堤防など定期的に堤防内にたまった淡水を放流している。このような放流水は農地からの影響を多大に受けており、河川水とは異なる高濃度の栄養塩を有した淡水であると予想される。それを特徴付ける淡水に由来している可能性がある *Nitrospira* Lineage に含まれるアンモニア酸化細菌群集を追跡することで、その影響範囲を推定することも可能であると考えられる。

## 4.4 嫌気性アンモニア酸化細菌群集解析

解析対象とした各地点の底質中におけるアンモニア酸化細菌群集構造を明らかにするため、プライマーセット Pla46f-Amx820r を用いた群集解析を行った。

得られた塩基配列情報（450~550bps）を用いて系統樹を Neighbor-Joining 法により作成した(MEGA3.1)。その際、系統樹を見やすくするために系統樹上で Cluster を作った。各 Cluster の詳細については異なる系統樹に示した。また、系統樹上で近縁であり、かつ、それらの塩基配列が 98%以上の相同性を持つもの同士を一つにまとめ OTU（操作上の種単位）を作成した。

### 4.4.1 東京湾の嫌気性アンモニア酸化細菌群集解析 (Anammox)

St.8 から 13 クローン、St.98 から 36 クローン、St.99 から 27 クローンが得られた。得られた塩基配列をもとに系統樹を作成した(MEGA3.1)。得られたクローンの多様性が極めて高く、かつ、現在 Anammox として登録されている塩基配列と近縁なクローンは得られなかった。

相同性の高い塩基配列同士をまとめ OTU を作成したが、各 OTU に含まれる塩基配列数は 3~6 クローン程度であり、どれも小規模な OTU となった。それぞれの OTU に含まれる塩基配列を見てみると、TB\_AMX\_OTU-1 は St.98 から検出されたクローンのみから構成されているものの、その他の OTU に関しては、3 地点から構成されるもの、2 地点から構成されるものもあり、さらにこれらの OTU は小規模であることから地点との関連性を見出すのは困難である。

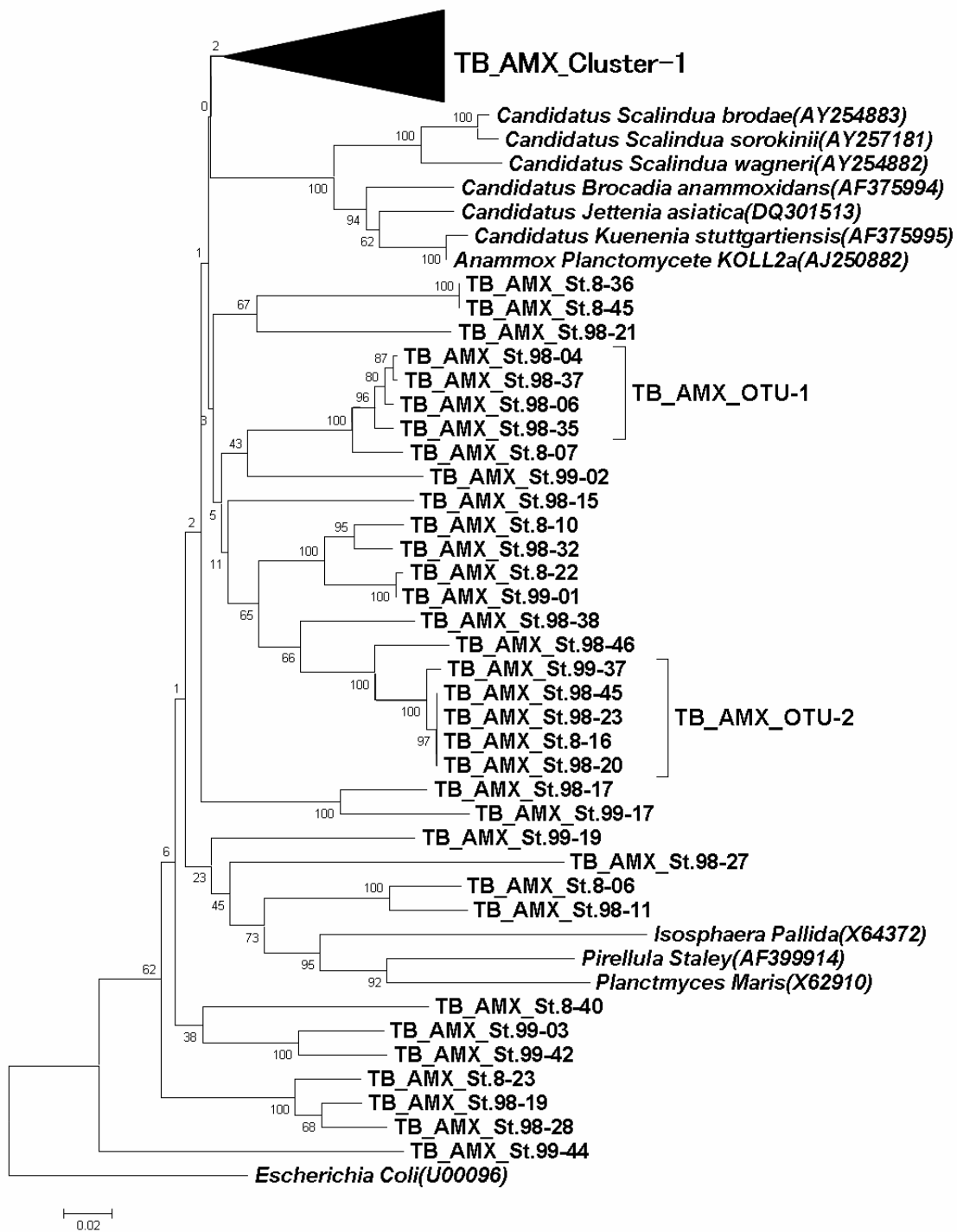
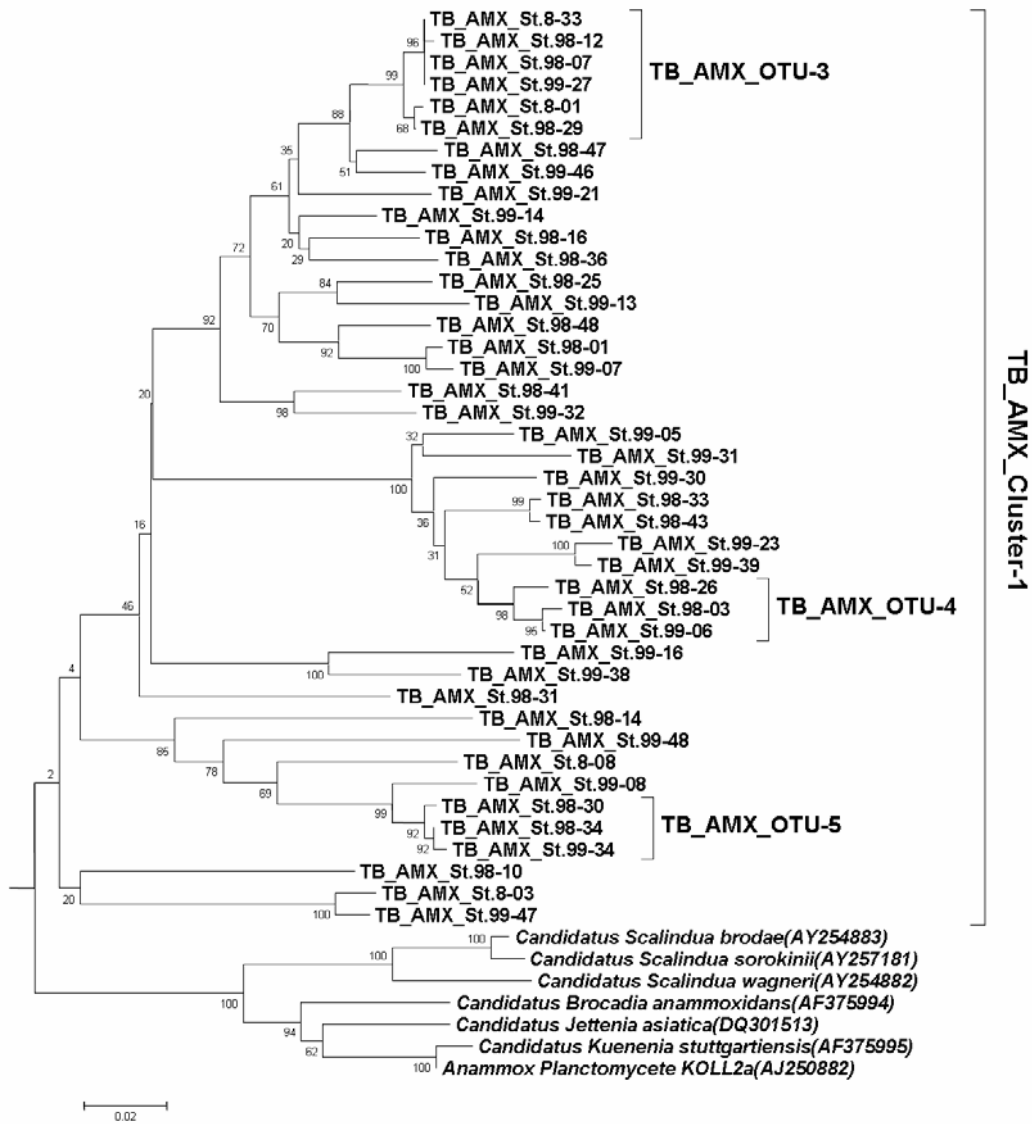


Fig. 4-5 Phylogenetic Tree of Anammox in Tokyo Bay(Neighbor-Joining method)

約 440bps の塩基配列から作成した Anammox 細菌の系統樹。TB は Tokyo Bay の略称。



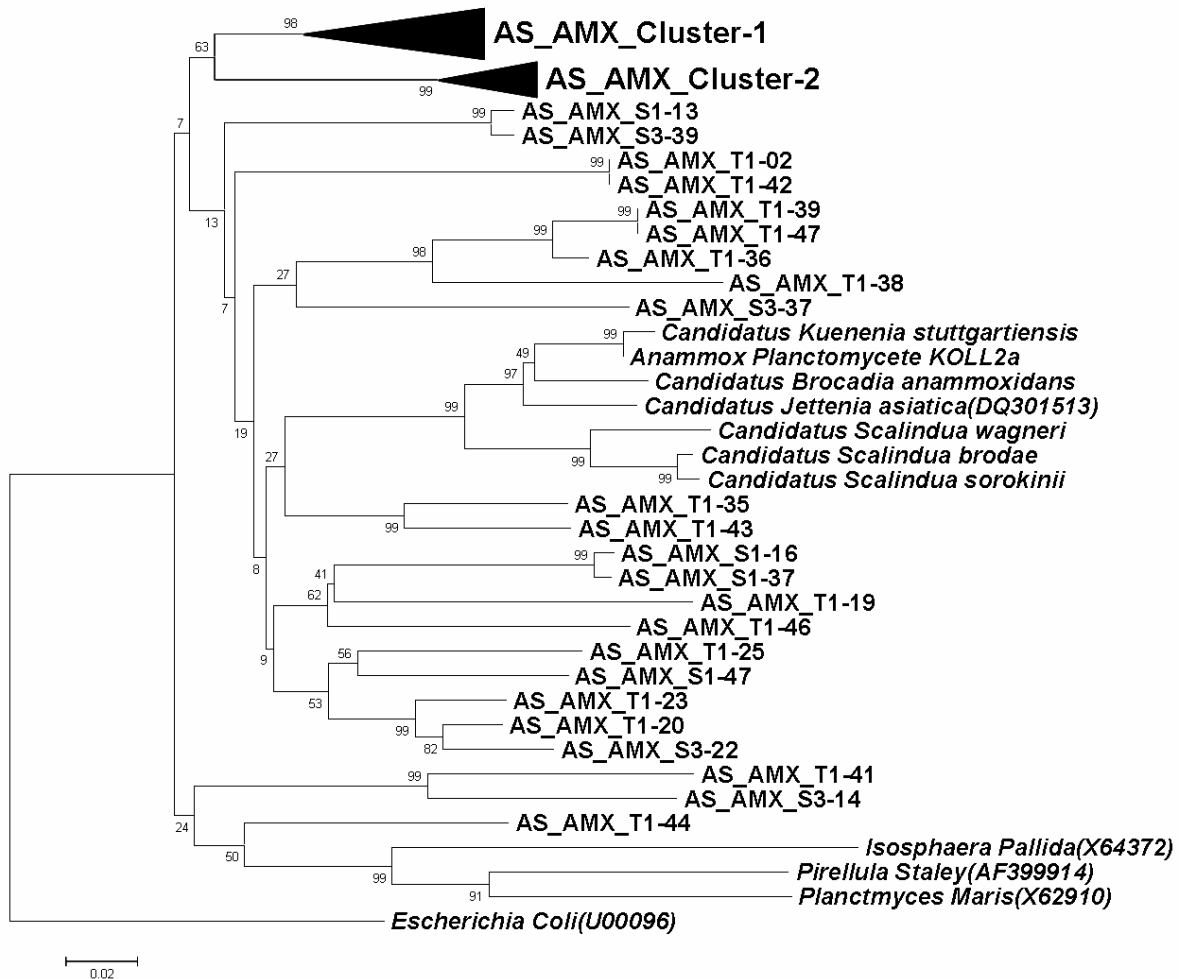
**Fig. 4-6 Phylogenetic Tree of TB\_AMX\_Cluster-1(Neighbor-Joining method)**

Fig.4-5にある Cluster-1の詳細。TBはTokyo Bayの略称。

#### **4.4.2** 有明海の嫌気性アンモニア群集解析

S1 から 27 クローン、S3 から 13 クローン、T1 から 22 クローンが得られた。得られた塩基配列をもとに系統樹を作成した(MEGA3.1)。東京湾と同様に、得られたクロンの多様性が極めて高く、かつ、現在 Anammox として登録されている塩基配列と近縁なクローンは得られなかった。

相同性の高い塩基配列同士をまとめ OTU を作成した。AS\_AMX\_OTU-1 は S1 と S3 殻検出されたクローンのみから構成された。しかしながら、Cluster 内の構成を見ても、地点間による違いは把握しづらい。そもそも、クローン同士の相同性自体がそれほど高くないことから、塩基配列情報による特徴づけは困難であると考えられる。



**Fig. 4-7 Phylogenetic Tree of Anammox in Ariake Sea(Neighbor-Joining method)**

約 440bps の塩基配列から作成した Anammox 細菌の系統樹。AS は Ariake Sea の略称。



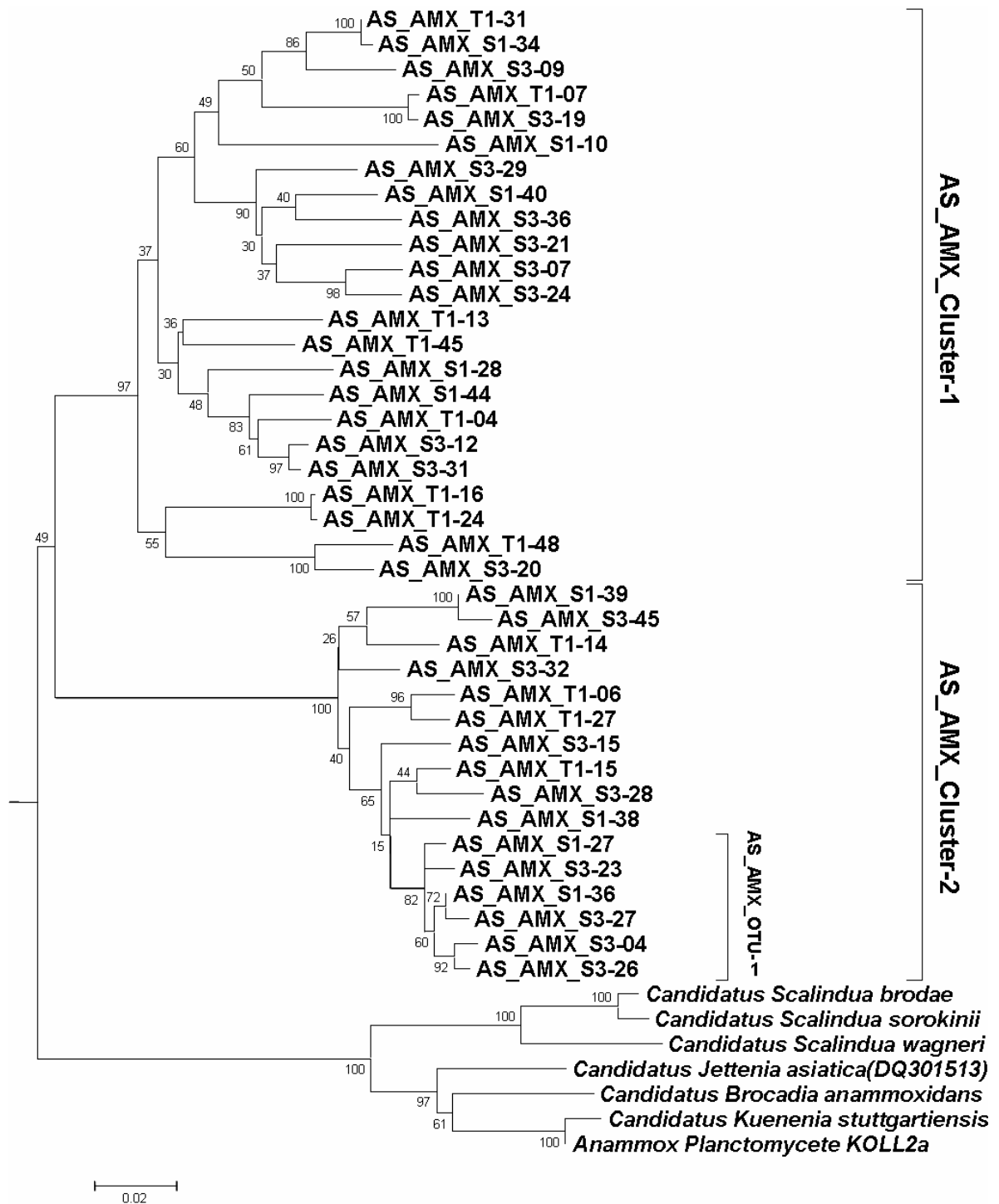


Fig. 4-8 Phylogenetic Tree of AS\_AMX\_Cluster-1&2(Neighbor-Joining method)

Fig.4-7にある Cluster-1,2の詳細。ASは Ariake Sea の略称。

#### 4.4.3 嫌気性アンモニア酸化細菌群集解析の考察

嫌気性アンモニア酸化反応、通称 Anammox 反応は、海洋における窒素循環の重要な役割を担っているとされ、さらに脱窒反応による窒素の除去効果は 50%以上ともされている (Dalsgaard et al.,2005)。

東京湾の底質環境を考慮すると、貧酸素化しており、かつ、富栄養化していることからアンモニアも存在していると考えられ、嫌気性アンモニア酸化細菌群集が生息していると推測される。しかしながら、本実験からは東京湾および有明海において、既知の嫌気性アンモニア酸化細菌と近縁と思われるクローンは検出されなかった。

また、期待していた結果と異なる実験結果が得られた原因として以下の点が挙げられる。

- Pla46f-Amx820r の嫌気性アンモニア酸化細菌に対する特異性の不足
- 既知の嫌気性アンモニア酸化細菌に関する塩基配列情報の不足
- Sequencing における解読塩基長の不足

本実験で使用した Pla46f-Amx820r プライマーセットは、フォワードプライマーに Planctomycetes 門を捉える塩基配列を用いている。現在報告されている既知の嫌気性アンモニア酸化細菌は Planctomycetes 門に属していることから、Planctomycetes 門を網羅的に捉えるプライマーとなっている。つまり、このプライマーセットであると、Planctomycetes 門に属しているものの、嫌気性アンモニア酸化を行っていない細菌の塩基配列も PCR の増幅対象に含まれてしまう。

次に、既知の嫌気性アンモニア酸化細菌株はごく少数であり、遺伝子情報も充実しているとは言いがたい。したがって、本研究で検出されたクローンが、実際には嫌気性アンモニア酸化反応を行っているものの、既知の嫌気性アンモニア酸化細菌株とは系統分類的に離れているという可能性が挙げられる。

最後に、本実験で行った Sequencing では、2本鎖 DNA のうち片側の解読しか行っておらず、また、解読された塩基配列長は 600~700bps 程度である。つまり Pla46f-Amx820r で増幅された領域の全てを網羅することが出来なかった。

これらの原因により、本実験においては東京湾および有明海のそれぞれ 3 地点における嫌気性アンモニア酸化細菌群集を的確に捉え、特徴付けることが出来なかったと考えられる。

## 4.5 まとめ

本章では、真正細菌群集・アンモニア酸化細菌群集・嫌気性アンモニア酸化細菌群集を対象とし、Cloning法を用いた微生物群集解析を行った。

嫌気性アンモニア酸化細菌群集の結果に関しては地点間の違いを把握するまでには至らなかったが、真正細菌群集およびアンモニア酸化細菌群集の解析結果からは、東京湾および有明海のそれぞれ3地点の細菌群集構造とその地点間による違いを把握し、それぞれの特徴を明らかにすることができた。

東京湾においては全体としては3地点で群集構造が似ているものの、湾中部と湾奥沿岸部で群集構造が異なり、また東京都側沿岸部と千葉県側沿岸部での違いも把握することができた。

有明海においては、筑後川河口付近に対する河川水流入の影響が群集構造の明らかな違いを生み出し、また、その一方で地点間の相違点と共通点を見出すことができた。

特に、アンモニア酸化細菌群集解析において、相同性の高い塩基配列を一つにまとめることで、より細かい微生物群集構造の違いを把握することができた。

以上より、微生物群集構造は各地点の環境を敏感に反映しており、微生物群集構造を用いた地点の特徴づけが可能であることが確認された。また、各地点もしくは特定の環境に対して特徴的な微生物群集を把握することができれば、その群集構造の経時的変化や平面的分布を明らかにすることによって、微生物群集構造が底質の機能やその挙動を明らかにするための指標になり得るのではないかと考えられる。

真正細菌群集とアンモニア酸化細菌群集を比べたとき、真正細菌群集は極めて多様性が高く、その中で特に注目すべき細菌群集が見えにくくなる可能性がある。一方、アンモニア酸化細菌は真正細菌に比べれば多様性が低く、そのわりには多くの研究が行われており、それぞれの種における性質も明らかになっている。またアンモニア酸化細菌は成長速度が遅いことで知られており、つまり生息環境の変化に対する瞬間的な反応よりも中期的な履歴性を持つことが予測され、指標として用いる上では適していると考えられる。

そこで、第5章以降では、アンモニア酸化細菌群集を解析対象とし、内湾の底質中の微生物群集解析を行っていくことにした。

## 第5章 T-RFLP 法によるアンモニア酸化細菌群集解析の手法の確立

本章では第4章で明らかとなったアンモニア酸化細菌群集における特徴的な群集構造の経時的変化および平面的分布を明らかにするため、CTO189f-CTO654r プライマーセットを用いた PCR-T-RFLP 法の実験条件を検討した。

T-RFLP 法を用いた微生物群集解析は多く行われており、その中に *amoA* 遺伝子を標的としたアンモニア酸化細菌群集の解析も含まれている。しかしながら本研究では CTO プライマーを用いており、このプライマーセットを使用した T-RFLP 法の既往研究は見つけることが出来なかった。そこで、第4章で得られたアンモニア酸化細菌群集の塩基配列データを用いて主要な OTU を検出できる T-RFLP 法の確立を目指した。

### 5.1 検討方法

T-RFLP 法を行うためには、制限酵素とその制限酵素によって処理した場合に得られる末端フラグメント (T-RFs) の長さとの関係がわかってなくてはならない。本研究においては、第4章で行った Cloning 法を用いたアンモニア酸化細菌群集解析の結果より、主要な OTU を的確に区別できるような制限酵素とその制限酵素を用いた場合に得られる T-RFs 値を DNASIS pro(日立ソフトウェア)を用いて検索・調査した。

次に、制限酵素処理が適切に行われる実験条件を決定するために実サンプルを用いて制限酵素量とその反応時間の最適化を行った。

最後に、Cloning 法による解析結果と T-RFLP 法による解析結果の比較を行った。

#### 5.1.1 DNASIS による制限酵素および切断サイト検索

まず制限酵素処理によって区別したい主要 OTU の選定を行い、OTU に含まれる塩基配列を DNASIS Pro に入力し、「制限酵素サイト検索」機能を利用して、同一 OTU に含まれる塩基配列が同一箇所では切断され、かつ、異なる OTU 間ではそれぞれ異なる T-RFs 値となる制限酵素の検索を行った。東京湾および有明海の主要 OTU と各制限酵素によって切断される T-RFs 値を Table.5-1 にまとめる。

第4章の結果より、東京湾では3つの OTU が作成された。そのうち主要な2つの OTU (『TB\_AOB\_OTU-1』と『TB\_AOB\_OTU-2』) を異なる T-RFs で切断できる制限酵素を検索した。いくつかの制限酵素が候補として挙げたが、より明確に検出されるピークを区別するために T-RFs 値がある程度離れている BsaJ I (New England Biolabs)を用いて、今

後の解析を行うこととした。

また、有明海では 6 つの OTU が作成され、このうち AS\_AOB\_OTU-2,3,4 は他の OTU に比べ非常に塩基配列が似ており、まとめて一つのグループとして扱うことにした。したがって、制限酵素処理で区別したい OTU は『AS\_AOB\_OTU-1』と『AS\_AOB\_OTU-2,3,4』と『AS\_AOB\_OTU-5』と『AS\_AOB\_OTU-6』の 4 つである。DNASIS pro による検索結果からは、これら 4 つのグループを一度に切り分ける適切な制限酵素は見つけられなかった。そこで複数の制限酵素を組み合わせることでこれら 4 グループを一度の反応で処理することを目指した。ここでもいくつかの組み合わせが候補としてあがったが、制限酵素はそれぞれに最適な反応温度や Buffer があり、それ以外の条件で処理すると期待された効果が得られない可能性がある。Table.5-2 に挙げた Hpy99 I, Hpy188III, HpyCH4IV(すべて New England Biolabs)は反応温度が同じであることからこの組み合わせを選んだ。しかしながら HpyCH4IVのみ最適 Buffer が他の 2 つと異なり、Hpy99 I と Hpy188IIIの最適 Buffer に合わせると、制限酵素処理活性が 25%に落ちることがわかった。これについての対策は 5.1.2 の制限酵素反応の条件検討で詳しく触れることにする。

**Table. 5-1 Restriction Endonucleases and T-RFs for Tokyo Bay samples**

Restriction Endonucleases	T-RFs	
	OTU-1	OTU-2
BsaJ I	84bps	338bps

**Table. 5-2 Restriction Endonucleases and T-RFs for Ariake Sea samples**

Restriction Endonucleases	T-RFs			
	OTU-1	OTU-2,3,4	OTU-5	OTU-6
Hpy99 I	—	94bps	—	—
Hpy188III	—	—	257bps	291bps
HpyCH4IV	326bps	—	—	—

### 5.1.2 制限酵素処理の条件検討

制限酵素処理を行うことで生じる T-RFLP 法のバイアスとして不完全な制限酵素処理が挙げられる。制限酵素処理が不完全であると解析対象とした細菌群集構造の真の姿を反映せず、実際よりも複雑化する可能性がある。したがって制限酵素量と制限酵素反応時間の最適化を試みた。

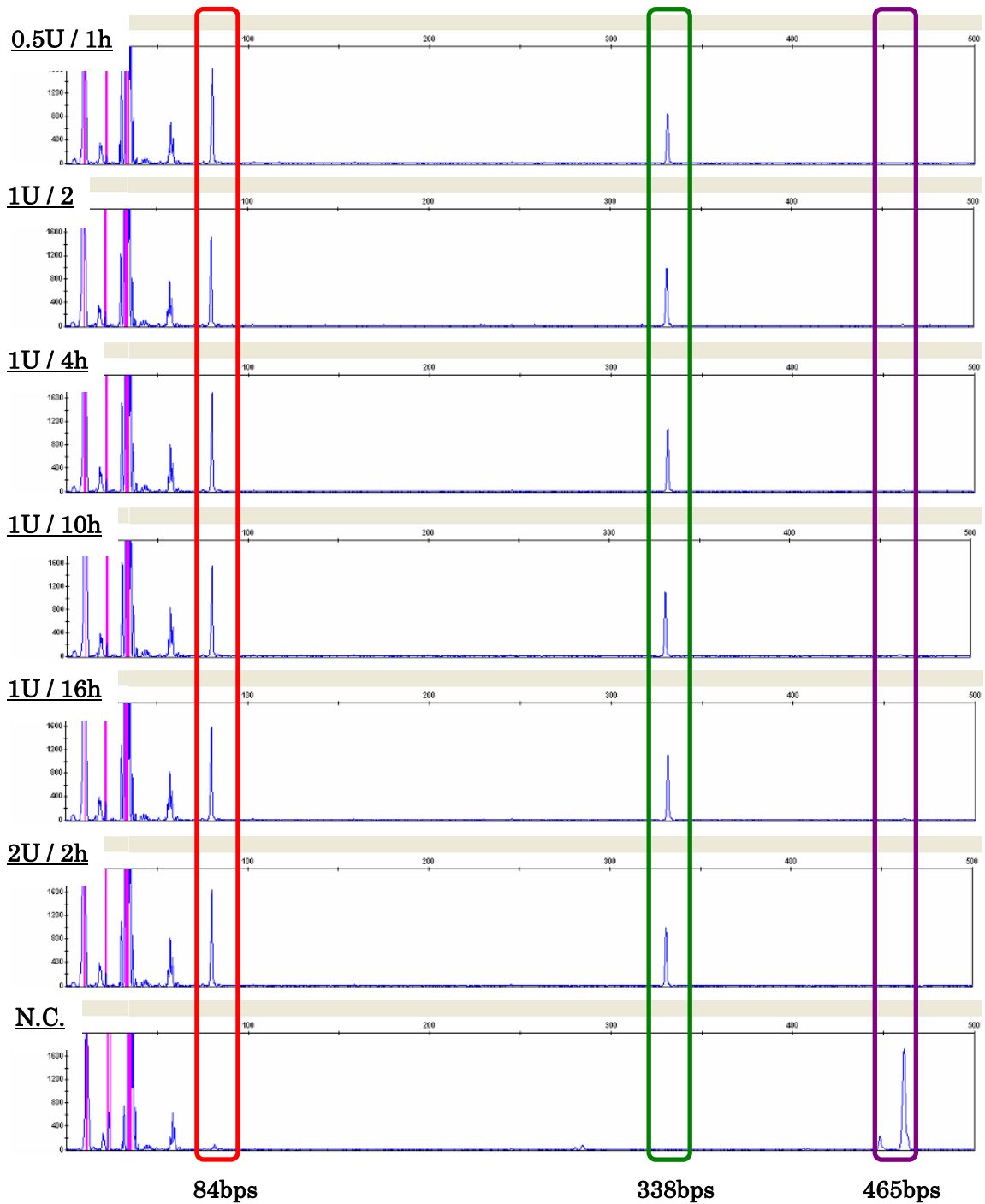
試験サンプルとして2005年10月に採取した東京湾の St.99 および有明海の S3 を用いた。検討した条件は下記の通りである。

制限酵素量・・・・・・・・・・反応時間を2時間に固定して 0.5U,1U,2U

制限酵素反応時間・・・・・・・・制限酵素量を1 Unit に固定して 2h,4h,10h,16h

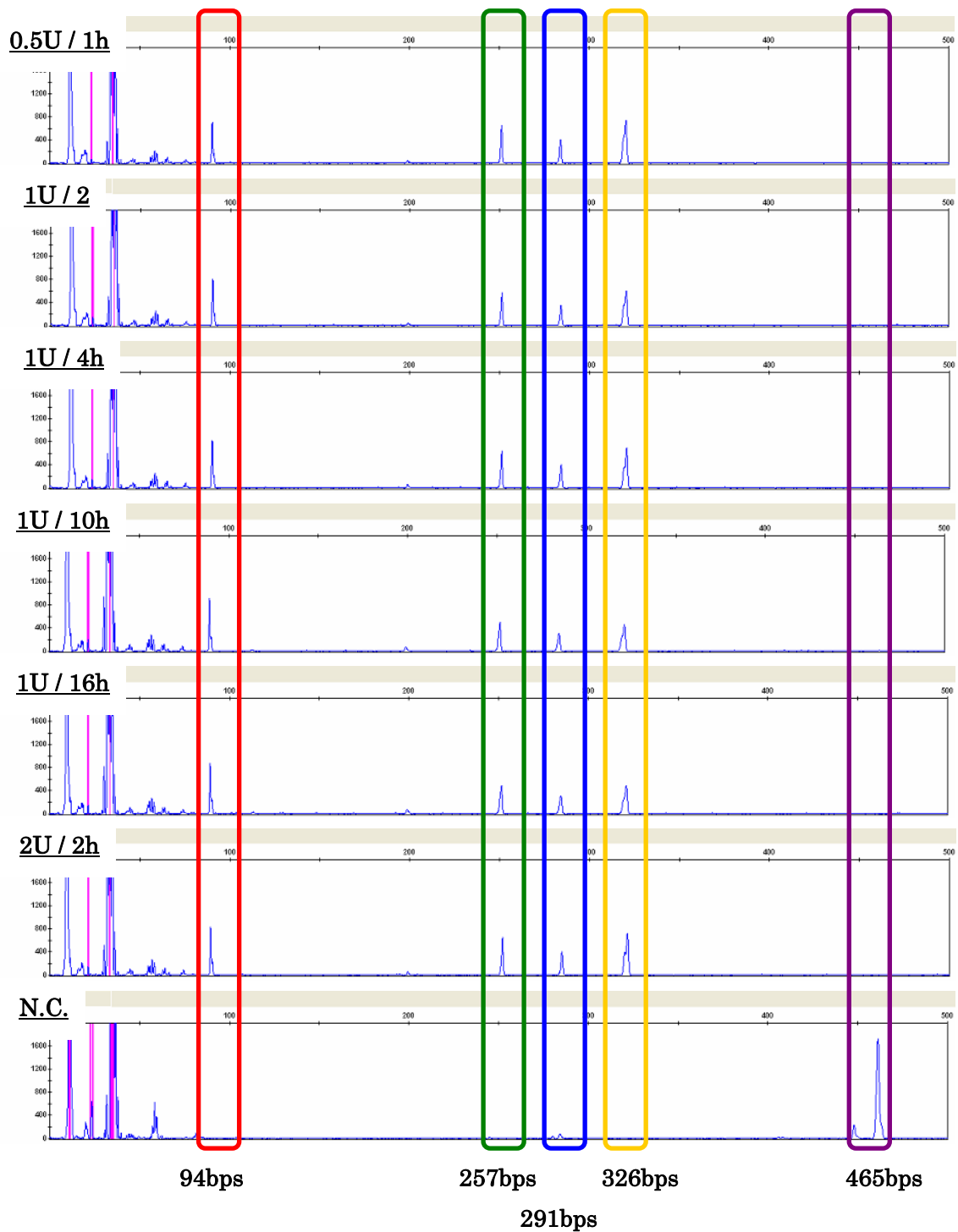
また、制限酵素処理反応液中の鋳型 PCR 産物量は 100~150ng/reaction となるように調整した。

制限酵素処理反応液中の Buffer は購入時に添付されてきた New England Biolabs 推奨のものを使用した。New England Biolabs は NEBuffer と呼ばれる4種類の Buffer を用意しており、制限酵素ごとに活性が最もよくなるものを推奨、添付してくる。しかしながら、有明海サンプルに用いる3つの制限酵素のうち、HpyCH4IVは最適 Buffer が NEBuffer①であるのに対し、他の2つは NEBuffer④であった。HpyCH4IVは NEBuffer④であると活性が25%まで落ちてしまうことから、本実験においてはその活性減少分を補うべく4倍量の制限酵素を添加することとした。検討実験の結果を以下に示す。



**Fig. 5-1 Result of exploratory experiment with BsaJ I**

東京湾 St.8 サンプルを用いて検討を行った。N.C.はネガティブコントロールとして未処理の PCR 産物。84bps は TB\_AOB\_OTU-1、338bps は TB\_AOB\_OTU-2 のピークであり、465bps は CTO プライマーセットによる増幅塩基長である。



**Fig. 5-2 Result of exploratory experiment with Hpy99 I ,Hpy188III and HpyCH4IV**

有明海 S3 サンプルを対象に検討を行った。94bps のピークは AS\_AOB\_OTU-2,3,4 を、257bps のピークは AS\_AOB\_OTU-5 を、291bps のピークは AS\_AOB\_OTU-6、326bps のピークは AS\_AOB\_OTU-1 を示している。また 465bps 付近のピークは CTO プライマーセットによる増幅塩基長である。



東京湾サンプル、有明海サンプルともに DNASIS により得られた T-RFs と同様の長さでピークが検出され、OTU 毎の切り分けが出来ている。また、94bps の位置よりも左側に現れる複数のピークに関しては、Negative Control から同じように検出されており、精製で除去できなかった未反応プライマーやプライマーダイマーであると判断した。その理由として、CTO189f プライマーは CTO189a, b, c よりなることから多くの複合塩基をもち、PCR mixture への添加量も一般的な PCR 反応におけるそれに比べ多く、未反応プライマーが多数存在することが予測される点が挙げられる。また、東京湾および有明海から得られたアンモニア酸化細菌の計 268 塩基配列を対象に各制限酵素の T-RFs を求めたが、80bps 以下で切断されるクローンは存在しなかったことから、94bps より左側に現れたピークはアンモニア酸化細菌由来のピークではないと考えた。

今回行った検討条件による比較を行ったが、東京湾 St.8 と有明海 S3 サンプルにおいては、制限酵素量と反応時間による違いは観察できなかった。つまり 100~150ng 程度の DNA 量であれば、0.5U, 2h で十分な処理が行われることがわかった。しかしながら、本研究では、異なる時期に異なる地点で採取した底質サンプルを解析対象とすることから、制限酵素量 1 U, 4h で制限酵素処理反応を行うことに決定した。制限酵素反応液と反応条件を以下に示す。

**Table. 5-3 Reaction mixture with BsaJ I**

Component	Final conc.	Volume[ $\mu\ell$ ]
ddH <sub>2</sub> O	—	13.2
10×NEBuffer①	×1	2
BsaJ I (2.5units/ $\mu\ell$ )	1unit	0.8
Template	100~150ng	4
Total	—	20

Template には精製した PCR 産物を用いた。

**Table. 5-4 Reaction Condition with BsaJ I**

step	Temperature[°C]	Duration time
activation	60	4hour
deactivation	85	20min

**Table. 5-5 Reaction mixture with Hpy99 I , Hpy188III and HpyCH4IV**

Component	Final conc.	Volume[ $\mu$ l]
ddH2O	—	12.7
10×NEBuffer④	×1	2
100×BSA	×1	0.2
Hpy99 I (2units/ $\mu$ l)	1unit	0.5
Hpy188III(5units/ $\mu$ l)	1unit	0.2
HpyCH4IV(10units/ $\mu$ l)	4unit	0.4
Template	100~150ng	4
Total	—	20

HpyCH4IVは最適 Buffer が NEBuffer④と異なり、その活性が 25%まで落ちるため 4 倍量添加することとした。

Template には精製した PCR 産物を用いた。

**Table. 5-6 Reaction Condition with Hpy99 I , Hpy188III and HpyCH4IV**

step	Temperature[°C]	Duration time
activation	37	4hour
deactivation	65	20min

### **5.1.3** 実サンプルを用いた Cloning 法との比較

5.1.2 で決定した実験条件にしたがって、第 4 章で解析した東京湾および有明海のそれぞれ 3 地点から採取した底質サンプルの T-RFLP 解析を行い、Cloning 法による解析結果と比較した。T-RFLP 法のデータ解析では、そのピークの面積を測定した値を用いて全体のピーク面積における OTU のピークが占める割合で構成比を算出し、Cloning 法においては得られた総塩基配列数に占める OTU 内塩基配列数をもって構成比とした。各サンプルにおける OTU 構成の比較を Fig.5-3 および Fig.5-4 に示す。

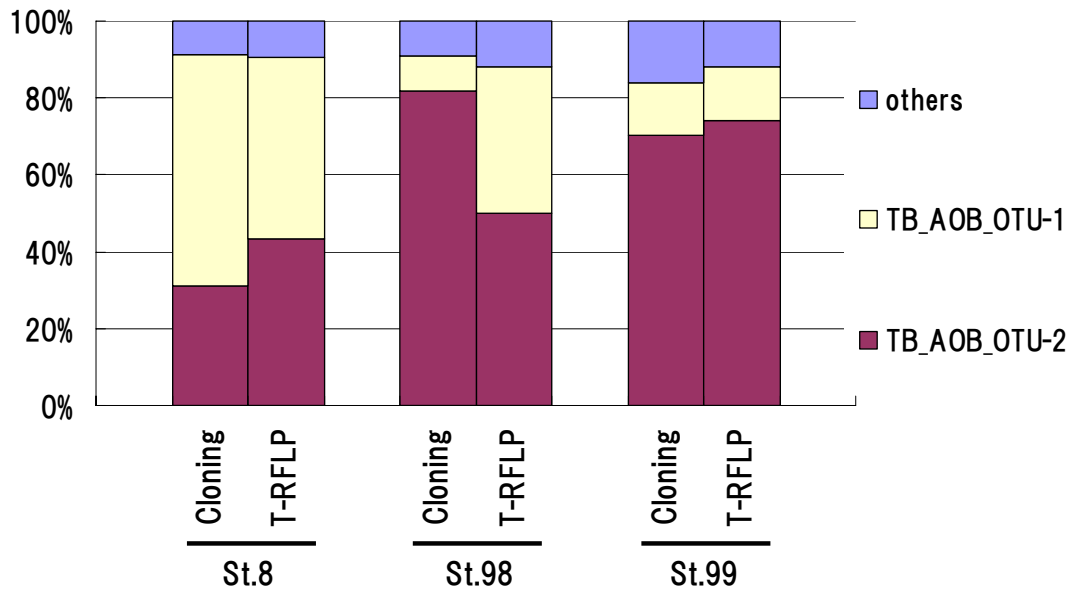


Fig. 5-3 Comparison of Cloning with T-RFLP in Tokyo Bay samples

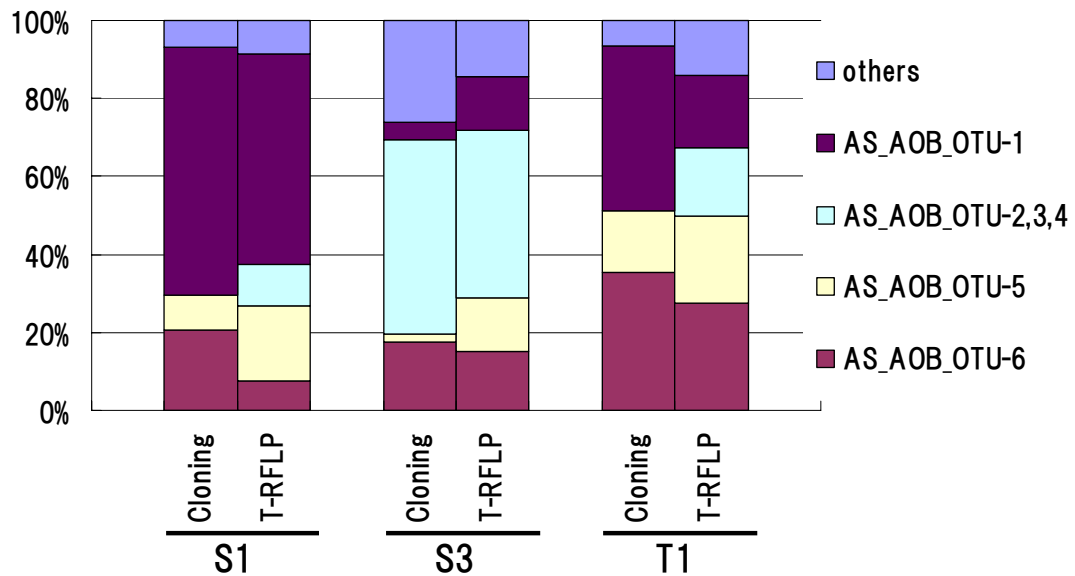


Fig. 5-4 Comparison of Cloning with T-RFLP in Ariake Sea samples

東京湾の3地点における Cloning 法と T-RFLP 法による解析結果の比較では、St.98 の TB\_AOB\_OTU-2 が異なる割合となったものの、その他の2地点では概ね同じ構成となった。また、有明海においては S1 と T1 の AS\_AOB\_OTU-2,3,4 が Cloning 法では検出されていないにもかかわらず T-RFLP 法では検出された。その他の構成はどの地点でも比較的似ている結果が得られた。

## 5.2 考察

PCR-Cloning-Sequencing 法は確率論的には実際の微生物群集構造を保存していると考えられるが、DNA 抽出時、PCR 時、クローンライブラリー作成時、Sequencing を行うコロニー（クローン）選択時など、さまざまなバイアスがかかる可能性を否定できない。一方で、PCR-T-RFLP 法は、PCR-Cloning-Sequencing 法に比べて PCR 以降のバイアスは生じないため、より実際の微生物群集を反映しており、その変化を鋭敏に捉えられると推測される。

本章の目的は東京湾と有明海の特徴的なアンモニア酸化細菌群集（それぞれの OTU）の経時的変動や平面分布を把握するための手法を確立することであり、地点ごとの違いを可視化し容易に比較できればよいので、本実験で決定した制限酵素処理反応条件で各地点におけるアンモニア酸化細菌群集の解析は十分可能であると判断した。

また、本実験により適切な制限酵素を選択することによって、環境サンプルを対象とし、種レベル以下での細菌群集解析が可能であることが明らかになった。

## 5.3 まとめ

5 章では CTO189f-CTO654r プライマーセットを用いたアンモニア酸化細菌群集の T-RFLP 法を行う上で必要な実験条件の最適化を行った。

まず、DNASIS を用いて第 4 章で得られた東京湾および有明海の主要な OTU の変動を捉えられる制限酵素もしくは制限酵素の組み合わせを検索した。その結果、東京湾サンプルには BsaJ I が、有明海サンプルには Hpy99 I, Hpy188III, HpyCH4IV が適していることがわかった。

次に、上記の制限酵素を用いた制限酵素処理反応の最適化実験を行い、制限酵素量と反応時間をそれぞれ 1unit, 4h と決定した。

最後に実サンプルを用いた Cloning 法と T-RFLP 法の比較を行い、概ね同様の結果が得られたことから使用した制限酵素によって標的とした OTU 塩基配列が想定し部位で切断されていることが確認できた。

これにより、第 6 章で行う、東京湾および有明海におけるアンモニア酸化細菌群集の T-RFLP 解析が可能となり、標的細菌群集の経時的変化と平面分布が把握する手法が確立された。

## 第6章 T-RFLP 法を用いた内湾底質のアンモニア酸化細菌群 集解析

第5章では、第4章の結果を受け、特定の OTU を判別できるような T-RFLP を行うべく、使用する制限酵素とその実験条件を決定した。本章では、第5章で確立した T-RFLP 法を用いてアンモニア酸化細菌群集解析を行う。

まず、東京湾および有明海の主要 OTU に含まれるアンモニア細菌群集構造が経時的にどう変化しているのかを明らかにするため、2005年5月~12月に採取した底質サンプルを用いて解析を行った。

次に、有明海を解析対象内湾とし、主要 OTU に含まれるアンモニア酸化細菌群集の湾内における平面分布を把握するために、2006年9月と12月に有明海内の24地点と有明海周辺の河川などから採取したサンプルを用いて多点解析を行った。また、2006年のサンプリングでは底質表層1cmと3cmで底質を取り分けることで、アンモニア酸化細菌群集の平面分布と共に、鉛直方向分布の把握も試みた。

また、T-RFLP 法による解析結果は、検出されたピーク面積の値からピークの占める割合を算出し、ピークに反映された各 OTU の構成比をもとめた。

## 6.1 2005 年度 東京湾

東京湾の 3 地点より採取した底質中におけるアンモニア酸化細菌群集構造の経時的変化を明らかにするため、2005 年 5 月、7 月、10 月に採取した底質サンプルを T-RFLP 解析に供した。解析結果を Fig.6-1 に示す。

各地点における経時的変化をみてみると、7 月に TB\_OTU-2 の割合が減少し、10 月に増加する傾向がすべての地点から観察された。また、St.8 と St.98 では比較的似た構成および挙動を示しているに対して、St.99 では 7 月を除く 5 月と 10 月で TB\_OTU-2 が大きな割合をしめていた。

千葉県水産総合研究センターの報告によると、東京湾内は夏場を中心に貧酸素化が生じており、7 月のサンプリング時には貧酸素水塊が広がっており、底質環境も少なからず影響を受けていたと考えられる。さらに、東京都側の沿岸部では 5 月ごろから貧酸素化の傾向がみられ、5 月~10 月にかけて慢性的に酸素不足の状況にあったと推測される。一方で千葉県側の沿岸部では 7 月を除く 5 月、10 月では貧酸素水塊は発生していないとされているが、本研究でサンプリングを行った St.99 は前述したように、埋め立てによる浚渫溝であり、一般的な内湾環境とことなっていることが想像される。現に、10 月のサンプリング時は底質付近において貧酸素化が確認されているが、St.99 が位置する窪地の直上水の DO 値が低いことは、St.99 の底質における細菌群集構造がその影響を反映しているとしても不思議ではない。

St.8 と St.98 は 5 月~10 月にかけて DO 値が低い環境にあり、劇的な経時的水質変動がなかったことから、同じような挙動が得られたと考えられる。また、St.99 においては 7 月に貧酸素化の影響を受けたものの、10 月には 5 月時の細菌群集構造が復活している様子が読み取れる。つまり、TB\_OTU-2 は貧酸素水塊との関連が強い細菌群集を含んでおり、一方で、TB\_OTU-1 は好气的環境と関連がある細菌群集を含んでいるという仮説が成り立つ。

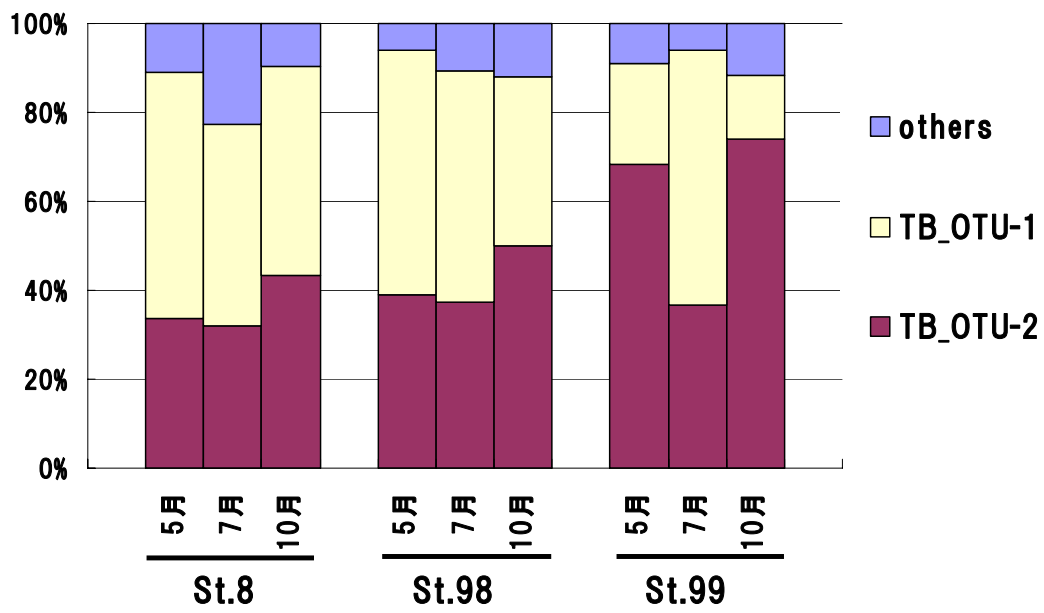


Fig. 6-1 Temporal shift of AOB in Tokyo Bay (2005)

## 6.2 2005 年度 有明海

有明海の 4 地点より採取した底質中におけるアンモニア酸化細菌群集構造の経時的変化を明らかにするため、2005 年 7 月、8 月、10 月、12 月に採取した底質サンプルを T-RFLP 解析に供した。解析結果を Fig.6-2 に示す。また、サンプリングに投げ込み式水質測定器によって観測した直上水質を Table.6-1 にまとめる

S1 においては、8 月を除いてその他の月では似た構成を維持しており、他の 2 地点に比べると、AS\_OTU-1 が特徴的であることがわかった。

S3 では 8 月と 12 月に AS\_OTU-5 の占める割合が増加し、それと同時に AS\_OTU-2,3,4 が減少する傾向がみられた。7 月~12 月間の変化は他の地点に比べ比較的少ないといえ、AS\_OTU-1 と AS\_OTU-6 はどの時期からもさほど変わりなく検出されている。

S4 においては、7, 8 月は AS\_OTU-1 が多くの割合を占めているが、10 月になると AS\_OTU-1 と AS\_OTU-6 が減少すると共に AS\_OTU-2,3,4 と AS\_OTU-5 の増加が観察された。10 月を除いた 7, 8, 10 月では AS\_OTU-5 と AS\_OTU-6 の割合が維持されている。

T1 では、7, 8 月間ではそれほど構造が変化しないものの、10 月で AS\_OTU-5 の増加と、それに伴う AS\_OTU-2,3,4 の減少が観察された。また 12 月は AS\_OTU-6 が検出されておらず、大きな群集構造の変化とそれに伴う環境変化が推測される。

サンプリングの直上水質データより、7 月の S1, S4 以外では貧酸素化していないことがわかる。S1 の 7 月~8 月にかけて DO 上昇 (2.2mg/L→4.7mg/L) や、S4 においては 8 月~10 月にかけての DO 上昇 (4.5mg/L→7.3mg/L) に伴って AS\_OTU-2,3,4 と AS\_OTU-5 の占める割合が増加している。しかしながらその他の時期や地点においては DO の上昇とそれらの OTU の割合が必ずしも関係しているとは言えず、さらには DO 以外の項目においても、現有的水質データからは細菌群集の挙動を推理することが難しい。



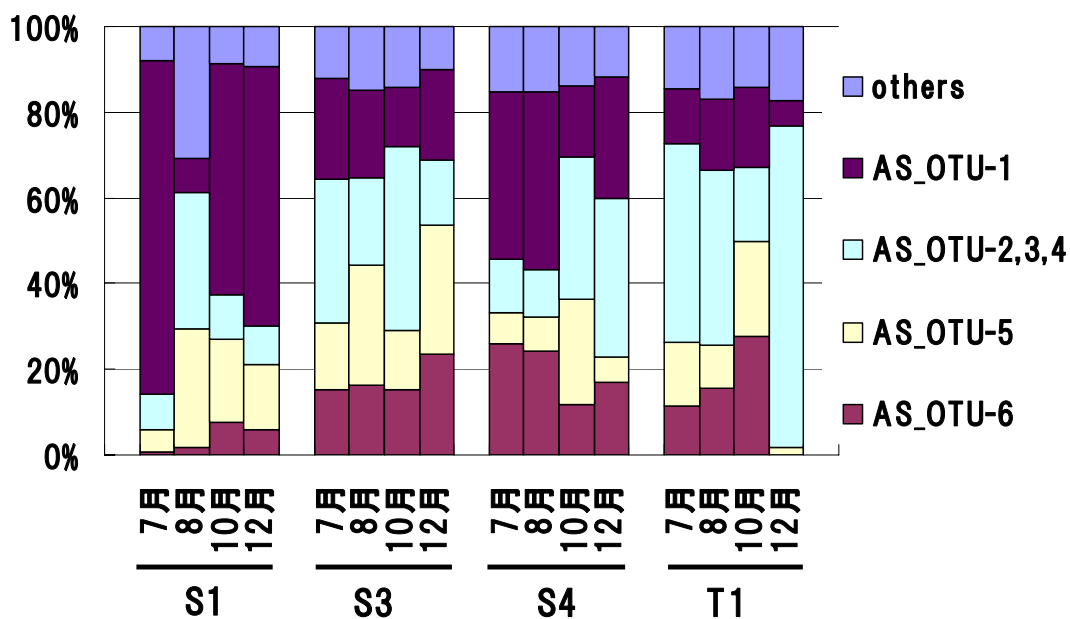


Fig. 6-2 Temporal shift of AOB in Ariake Sea

Table. 6-1 Data of water quality

		depth	temp.	salinity	DO	pH	turbidity
		[m]	[°C]	(PSU)	(mg/L)		
7月	S1	11.8	23.8	27.6	2.2	7.6	2.5
	S3	3	27	24.8	5.5	8.0	18.3
	S4	4.7	24.9	28.6	1.3	7.5	21.9
8月	S1	15.8	26.7	30.6	4.7	8.1	7.6
	S3	5.6	27.1	29.5	4.6	7.9	46.5
	S4	5.4	27.3	29.4	4.5	7.7	63.3
10月	S1	11	24.5	31.2	6.8	8.2	3.1
	S3	3.3	24.5	29.7	5.3	8.1	22.2
	S4	4.5	24.3	30.5	7.3	8.2	58.7
12月	S1	12.5	15.1	31.7	7.9	8.4	21
	S3	3.8	10.7	28.9	8.6	8.4	19.8
	S4	5.3	11.5	29.8	8.9	8.3	17.3

### 6.3 2005 年度サンプル解析の考察

東京湾および有明海の底質におけるアンモニア酸化細菌群集の経時的変化および平面分布を T-RFLP 法により解析した。その結果、地点間および季節間における細菌群集構造の推移を把握することができた。

東京湾においては 5 月~10 月において慢性的に貧酸素化していた東京湾都側 (St.8 と St.98) と 5 月, 10 月の直上水は貧酸素化していなかった千葉県側 (St.99) で異なる経時的変化を示された。また、7 月の群集構造が 3 地点で似ていることから貧酸素化が細菌群集構造に影響を及ぼしている可能性が示された。

有明海においては各地点, 各月でそれぞれが少なからず異なるアンモニア酸化細菌群集の構成を持っていることがわかった。また東京湾に比べると地点間, 季節間の変動が大きく、水質データとの関連性もより複雑であろうことが推測された。しかしながらこのことは、有明海において細菌群集構造に与える影響因子に水質データ以外が含まれていることを示唆しており、底質の輸送が細菌群集に影響を与えているのではないかと考えられる。

また、呉ら (2006) の報告によると、東京湾の三番瀬における底質の堆積量は年間で約 1cm~3cm 程度であると推測される。2005 年度のサンプリングでは底質表層約 3cm を採取していることから、数ヶ月の間に、表層 3cm が全く新しい底質になることは考えにくい。しかしながら、本研究においては、短い期間での細菌群集構造の変化が確認されており、底質が細菌群集を伴って湾内を移動していることを裏付ける結果が得られた。つまり、水質データからは読み取れなかった細菌群集構造の違いは、細菌群集が持つ環境変化の履歴性を示しており、特徴的な細菌群集構造の挙動を追跡することで、標的とした細菌群集の由来を明らかにすることが可能であると考えられる。さらに標的とした細菌群集の分布を密に把握することで、湾内における底質の輸送と形成などについての新たな知見が得られると期待できる。

この結果をうけて、6.4 では有明海のアンモニア酸化細菌群集構造の平面分布をより密に把握し、さらに表層 1cm と 3cm で底質を取り分けることで細菌群集を用いた地点ごとの特徴づけを行い、ここで得られた知見をより確実なものとするを旨とする。

## 6.4 2006年度 有明海

ここでは、有明海におけるアンモニア酸化細菌群集の分布を明らかにするため、第5章により確立された T-RFLP 法を用いてアンモニア酸化細菌群集解析を行った。サンプリング地点は有明海内24地点とその周辺河川など7地点(Fig.3-3 参照)であり、サンプリングの際、表層1cmと3cmで鉛直方向に底質を取り分けた。また、サンプリングは2006年9月27日と12月8日に行った。

### 6.4.1 2006年9月サンプルのアンモニア細菌群集解析

2006年9月に採取した底質サンプルを用いて行った T-RFLP 解析結果を Fig6-3 に示す。底質表層1cmにおいては26地点、底質表層3cmにおいては27地点の解析結果が得られた。

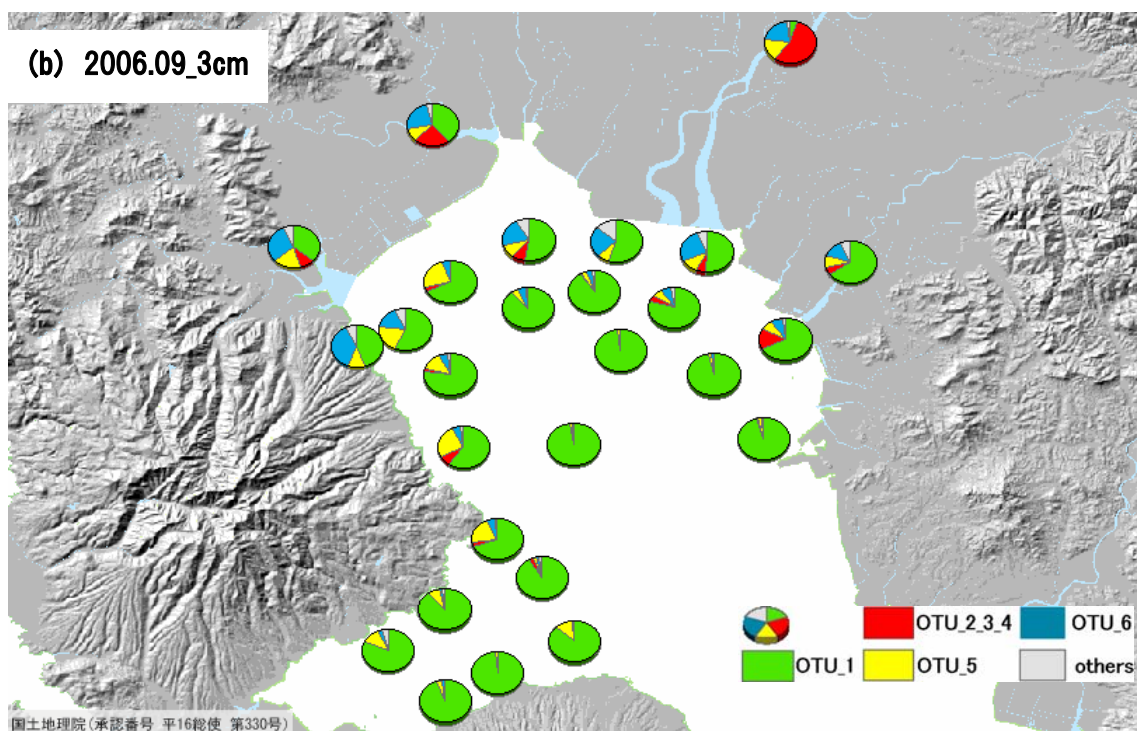
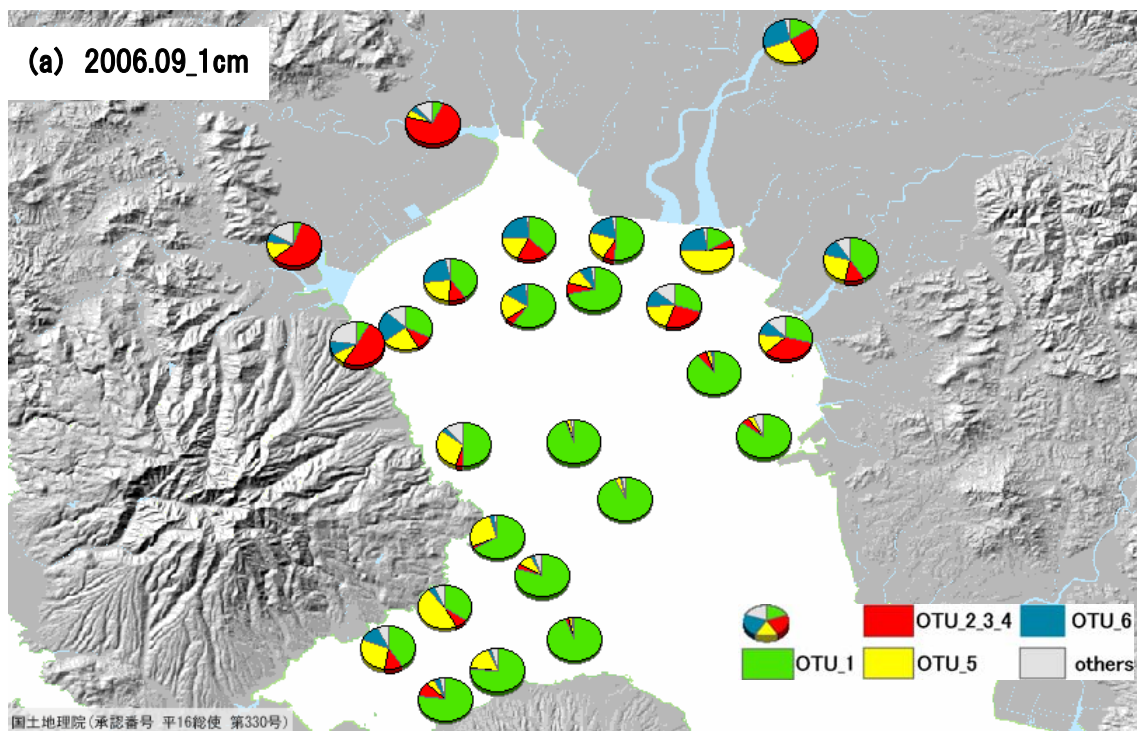
#### 2006.09 1cm

各地点の構成を比べてみると、湾央部では OTU-1 が占める割合が多くなっている。湾奥北西部の六角川、塩田川、干潟を筆頭に湾奥の陸域や陸域に近い沿岸部で OTU-2,3,4 が検出されており、陸域から沿岸、湾央へ向けてその割合は小さくなっている。さらに諫早湾の北側や湾奥の沿岸部と北東側から注ぐ河川においては OTU-5 や OTU-6 が検出されている。OTU-6 は特に湾央部 (St.10~St.17) と筑後川に多く含まれているものの、北西部の陸域 (六角川、塩田川、干潟) 付近ではそれほど多くは検出されていない。

底質表層1cmにおいて OTU-5 や OTU-6 は北西部側河川における割合が少ないにもかかわらず、筑後川・下から有明海北部沿岸を通過して諫早湾の北部側に帯状に分布している。また、六角側や塩田川で多く検出された OTU-5 と OTU-6 は湾奥北西側沿岸部において優占しているとはいえない。これは、有明海に対して、六角川や塩田川が及ぼす影響よりも筑後川からの影響が強く、その影響範囲は湾奥沿岸部沿いに諫早湾まで及んでいると考えられる。

#### 2006.09 3cm

底質表層3cmにおいては、筑後川・下を除き、湾央部を中心にどの地点においても OTU-1 が多くの割合を占めている。さらに OTU-2,3,4 は筑後川・下と六角川でこそ多く検出されているものの、その他の地点では占める割合が少なくなっている。OTU-5 は陸域や沿岸部で検出されており、湾央部を除いて割合は多くないながらも全体的に分布している。また湾奥北部と陸域一帯で OTU-6 が検出されており、湾央や諫早湾へ向けてその割合は減少している。



**Fig. 6-3 Distribution of AOB Community in Ariake Sea (2006.09)**

2006年9月に採取した底質サンプル中のAOBをT-RFLPで解析したもの。(a)が表層1cmで、(b)が表層3cm。円グラフのない地点は底質の採取または底質からのDNA抽出が出来なかった地点である。

#### **6.4.2** 2006年12月サンプルのアンモニア細菌群集解析

2006年12月に採取した底質サンプルを用いて行ったT-RFLP解析結果をFig6-4に示す。底質表層1cmにおいては30地点、底質表層3cmにおいては31地点から解析結果が得られた。

##### **2006.12 1cm**

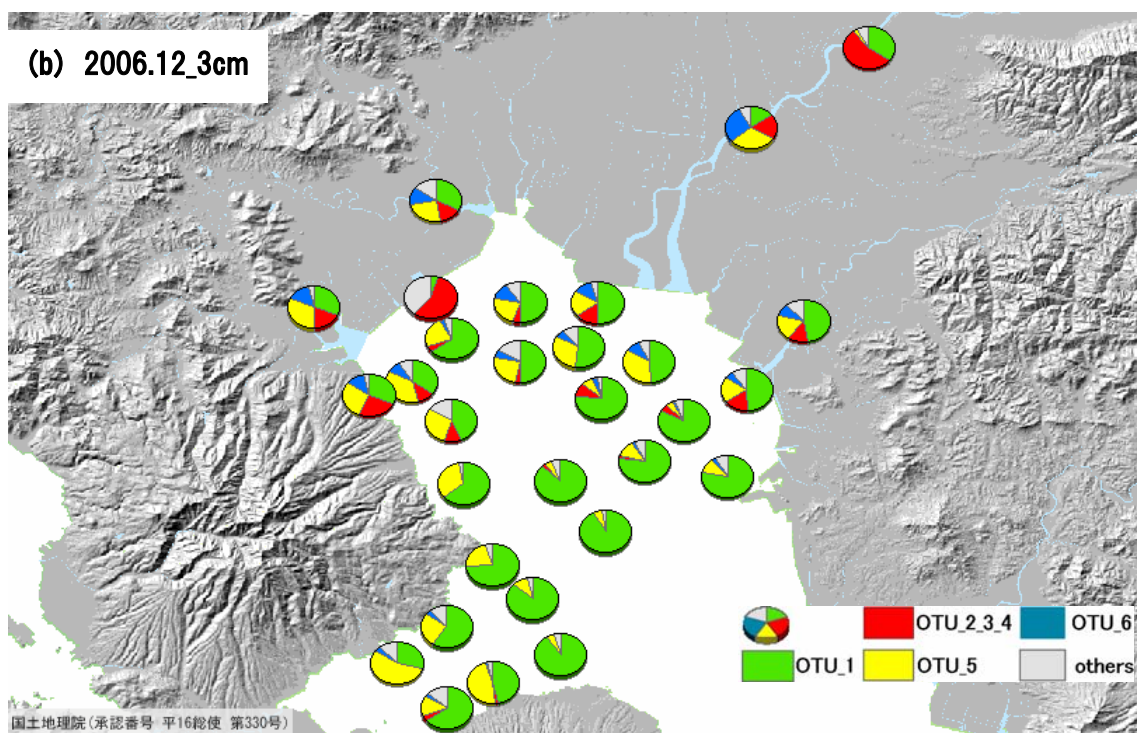
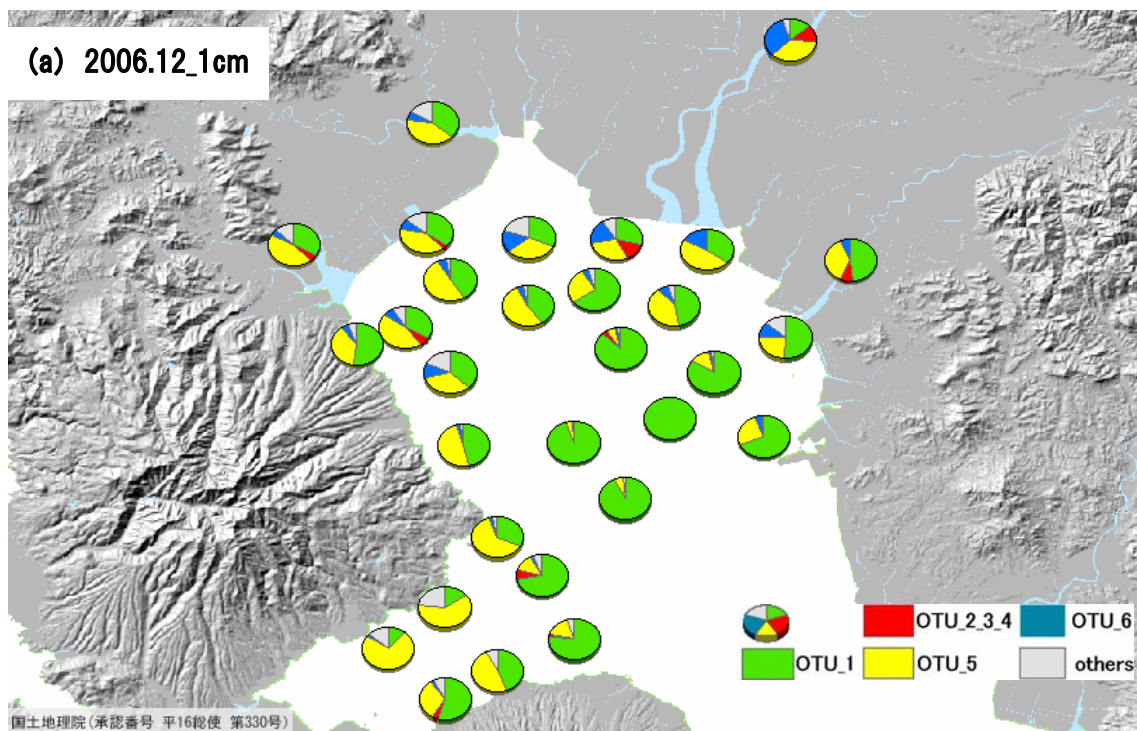
12月に採取した底質表層1cmにおいては、OTU-1は全ての地点から検出されているが、9月サンプルと比べるとその割合と優占している範囲は明らかに小さくなっている。それと同時にOTU-2,3,4の占める割合も各地点においてかなり少なくなっている。その一方で、諫早湾をはじめとする有明海西側沿岸部から筑後川付近にかけてOTU-5が多く検出されている。また、OTU-6は湾奥北部側から主に検出しており、湾央や諫早湾においてはその割合は極めて小さいか皆無である。

12月の底質表層1cmサンプルにおいては湾内のアンモニア酸化細菌群集構造が、筑後川・下よりも六角川や塩田川の構造と似ていることがわかった。

##### **2006.12 3cm**

ここでもOTU-1は全ての地点から検出されており、湾央部を中心にその占める割合も高いことがわかった。また、筑後川・上やその他の河川においてOTU-2,3,4が存在しており、湾央に向ってその割合は減少した。有明と干潟ではOTU-2,3,4が特徴的であるが、これはこの2地点が潮汐によって環境が変化するいわゆる「干潟」であることが関係しているかもしれない。OTU-6は湾奥沿岸部を中心に検出されているにもかかわらず、湾央と諫早湾からはほとんど検出されていない。

今回初めて解析結果が得られた筑後川・上と筑後川・下を比べるとその群集構造は明らかに異なっている。これはこの2地点間にある堰によって筑後川・上には海水の影響が及ばなくなっていることが原因として考えられる。



**Fig. 6-4 Distribution of AOB Community in Ariake Sea (2006.12)**

2006年12月に採取した底質表層3cmサンプルをT-RFLPで解析したもの。(a)が表層1cmで、(b)が表層3cm。円グラフのない地点は底質の採取または底質からのDNA抽出が出来なかった地点である。

## 6.5 2006 年度サンプル解析の考察

第 4 章において OTU-1 は *Nitrosospira* Lineage に属し、ここに含まれる単離株は全て塩分耐性をもっていないことから、OTU-1 は淡水域の影響を反映しているのではないかと考えた。しかしながら本実験から、OTU-1 は湾央部の特徴的な細菌群集であり、9 月および 12 月の底質サンプルにおいても湾央部から多く検出された。したがって、OTU-1 に含まれたクローンは *Nitrosospira* 属ではあるが既知の単離株とは性質が異なると考えられる。一方、それ以外の OTU は 2006 年度の解析において、陸域もしくは淡水の影響を少なからず受けたものであると考えられる。

9 月と 12 月ともに、底質表層 1cm と 3cm で群集構造の比較してみると、1cm に比べて 3cm サンプルのほうが、全体的に地点間の変動が小さい。また、優占している OTU が 1cm と 3cm で異なることが陸域と湾奥沿岸部に位置する地点で顕著になっている。このことは、河川や陸域とその影響を受ける河口・沿岸域での底質表層部が頻繁に変化していることを示唆し、底質の巻上げ・輸送が細菌群集の分布に大きな影響を及ぼしているということの裏づけであると考えられる。つまり、底質表層部の細菌群集の挙動を追跡することで底質の輸送・形成のメカニズムを解明することができる可能性は大いにあり、そういった意味で微生物群集構造は一つの指標になり得ると考えられる。

また、9 月の底質表層 1cm サンプルでは OTU-5 と OTU-6 が筑後川付近から湾奥沿岸部を沿うように諫早湾内の北部まで共通して存在しており、それ以外でも OTU-1 を除く他の OTU が湾央部を囲むように分布している傾向が見られる。このことは、それぞれの OTU の分布が河川などの影響範囲や様々な環境を反映している可能性を示している。

さらに、9 月および 12 月の全体的な分布をそれぞれ比較してみると、底質表層 1cm では 9 月と 12 月で全く異なる細菌群集構造を有しており、底質表層 3cm でも若干の類似点はあるものの、明らかに異なる地点が多いことがわかる。しかしながら、9 月の底質表層 1cm と 12 月の底質表層 3cm を比べたとき、各地点で比較的似た群集構造を持っていることが確認できた。これは、9 月に底質表層 1cm にあった細菌群集がその上に底質の堆積が起こった結果であり、鉛直方向への経時的推移も細菌群集構造は反映していることが確認された。

## 6.6 まとめ

本章では、

- ① 東京湾と有明海のそれぞれ 3 地点におけるアンモニア酸化細菌群集構造の経時的变化
- ② 有明海と有明海周辺河川におけるアンモニア酸化細菌群集の平面分布

を明らかにするため第 5 章で確立した手法を用いてアンモニア酸化細菌群集解析を行った。

①より、2005 年度の東京湾 3 地点では地点間の群集構造の違いが明らかになると共に、群集構造は貧酸素化の影響を受け、その構造を変えていたことが確認できた。また、2005 年度の有明海 4 地点においては地点間で群集構造が異なることが明らかになり、かつ、東京湾にくらべ、経時的変動が大きくあらわれていた。これは水質環境の変化によるものだけでなく、それ以外に要素、例えば底質の輸送などが群集構造に大きく影響を与えていると推測された。

次に、有明海における多点解析より、湾内および周辺河川におけるアンモニア酸化細菌群集の分布を明らかにすることができた。このとき、第 4 章で確立した T-RFLP 法を用いた細菌群集解析によって、有明海の各地点におけるアンモニア酸化細菌群集の挙動を鋭敏に捉えられることが確認できた。地点の環境を反映している細菌群集の存在を把握し、細菌群集構造から地点の特徴づけを行うことの可能性を示すことができた。また細菌群集の平面分布と鉛直分布より、有明海において底質の輸送が頻繁に生じていることが示唆された。河川水の影響範囲や底質の輸送を細菌群集が反映していることを確認することが出来た。

以上より、微生物群集構造は各地点の環境を反映しており、各地点の特徴づけや底質の機能、さらにはその挙動と形成を明らかにするための指標として微生物群集構造が利用できることを示すことができた。



## 第7章 総括

### 7.1 研究の成果

第1章で述べたように本研究の目的は、

微生物群集構造を通じて環境を把握することを目指し、

① 分子生物学的手法を用いた微生物群集解析によって内湾底質中の特徴的な微生物群集の把握

② それらの微生物群集の経時的变化および平面的分布を追跡

を行うことで内湾底質中の微生物群集構造について新たな知見を得ること

である。これにしたがって本研究の成果をまとめる。

そもそも本研究は底質と微生物群集との深い結びつきに着目してところから出発している。分子生物学的手法の発展に伴い微生物群集の解析は容易に行えるようになった。しかしながら一方で、富栄養化などの環境問題を抱える内湾において様々な機能を持つ底質の挙動解明は極めて重要である。しかしながら、従来の調査手法では底質の挙動を正確に把握することは困難であった。そこで、底質中に存在する微生物群集を解析することで、底質の挙動を把握できるのではないかという発想に至った。

本研究では、まず内湾底質中にどのような微生物が存在しているのかを把握することから始めた。その結果、第4章で示したように、東京湾および有明海における真正細菌群集とアンモニア酸化細菌群集の構造を把握することができた。さらにそれらの群集構造を塩基配列情報から整理することで、地点ごとの特徴を明らかにした。

ここで、将来的な環境指標としての可能性を考慮し、解析対象をアンモニア酸化細菌群集に絞り、その後の解析を行うこととした。

T-RFLPを用いた微生物の群集解析は多く行われているが、CTOプライマーセットを用いたアンモニア酸化細菌群集のT-RFLP解析の報告はない。そこで第5章では、第4章で得られた解析結果から、適当な制限酵素を検索し、実際の底質サンプルを用いて実験条件の検討を行った。その後Cloning法との比較で解析結果の評価を行い、特徴的なアンモニア酸化細菌群集の挙動を追跡する手法を確立した。

第6章では、第5章で確立した手法を用いて、アンモニア酸化細菌群集の経時的变化と平面分布を明らかにした。東京湾と有明海の2005年度サンプルを用いた解析からは、地点

ごとの群集構造とその季節変動が明らかになり、また地点間の違いも確認することができた。これにより、アンモニア細菌群集が地点ごとの環境を表しており、さらに環境の季節変動も反映していることから、トレーサーとしての可能性を示すことができた。

次に行った有明海の多点解析からは、アンモニア酸化細菌群集の密な平面分布と鉛直方向での違い、さらには秋と冬での季節変動を把握することができた。細菌群集の鉛直方向での違いは、有明海の底質が頻繁に輸送されていることを示唆し、また、特徴的な細菌群集の分布は、河川などの影響範囲、さらには底質の挙動を推測させるものであった。

以上より、本研究の目的であった、微生物群集構造を通じて環境を把握することは少なからず達成されたと考えられる。また、

- 内湾底質と微生物群集が密接な関係にあること
- 微生物群集構造が環境を反映していること

さらに、

- 微生物群集が環境を観察する上で指標として利用できることを本研究により示すことが出来たと確信している。

## 7.2 今後の展望

本研究から、微生物群集が底質内の環境を反映しており、内湾環境や底質挙動を明らかにする上で微生物群集構造が一つの指標として用いることができる可能性が示された。また、現在、富栄養化問題を抱える東京湾と有明海において、底質との密接な関係が確認された。

第1章でも述べたように、内湾における底質は様々な機能を有しており、極めて重要な役割を担っているにもかかわらず、その底質がどのように形成され、またどのように移動しているのか、十分な知見が得られていないのが事実である。しかしながら、底質のもつ機能やその挙動を解明することが出来れば、富栄養化の改善や、貧酸素化の防止など、様々な対策が可能になると考えられる。そういった意味で、内湾底質における微生物群集を解析することは、底質の挙動把握のみならず、将来的には底質の環境浄化能力の評価にもつながり、工学的かつ社会的な意義を持つこと可能になる。さらには、多くの提唱されている水質モデルにおいて底質が持つ水質浄化機能などを微生物群集構造から提案することが出来るかもしれない。

そういった視点に立って本研究を眺めたとき、底質と微生物の関連性を明らかにした本研究はこれで終わるものではなく、基礎的知見が得られたに過ぎない。そこで、今後の展望として、さらに多くの地点や定期的な解析を行うことで環境を反映している真の微生物群集の発見、硝化・脱窒などの特定機能を有した微生物群集の把握が望まれる。また、本研究では行わなかった底質における微生物群集の定量、微生物の有する機能の活性評価、水質モニタリングとの比較などの作業も挙げられ、更なる実験・研究により本研究で得られた知見が確実なものとなること期待している。

## 謝辞

修士課程 2 年間の研究は多くの方々に支えられながら、一步一步、進めることが出来ました。その成果を本論分にまとめるにあたり、お世話になった方々にこの場を借りて御礼申し上げます。

味埜俊先生（新領域創成科学研究科社会文化環境学専攻教授）には、学術的興味に偏りがちな私の研究について、その目的と工学的・社会的意義を持つことの重要性を教えてくださいました。グループミーティングなどのご指導・ご助言はまさに私の研究における弱点を突いており、その度に初心に帰り、自らの研究の位置づけと、私自身の主体性を見つめ直す機会を与えてくださいました。また研究のだけに留まらず、就職活動の際にもご指導いただきました。指導教官である佐藤弘泰先生（新領域創成科学研究科社会文化環境学専攻助教授）には、研究計画から実験の手法に至るまでご教授いただき、そもそも佐藤先生のアイデアから始まったこの研究の本質を捉えられずに的外れな私を丁寧に指導していただきましたことを心より感謝しております。また、小貫元治先生(サステナビリティ学連携研究機構特任講師)には、特に実験手法について多くのご指導と、研究の方向性や結果の出し方など貴重なご助言をいただきました。

さらに副指導教官である鯉淵幸生先生（新領域創成科学研究科社会文化環境学専攻講師）には、研究計画についてのご指導や東京湾および有明海の底質サンプリングにおいて、大変お世話になりました。特に有明海サンプリングでは 8 時間におよぶ戦場と化した船上での作業、元来酔いやすいであろう私の無能さを責めることなく、支えていただき心より感謝しております。沿岸環境や海の厳しさを微塵も知らない私に『本当の環境学』を考えるきっかけを作ってください、海の上で経験したことは一生忘れることはないでしょう。

味埜・佐藤研究室のメンバーには様々な面でお世話になりました。当専攻博士課程 3 年の小田和賢一さん、福島寿和さん、末岡一男さん、また同 2 年の押木守さんには研究面はもちろんのこと、精神的にも支えられ、磐石の態勢で実験に望むことができました。また、プレハブ在籍時は、宇田直樹さん（みずほフィナンシャルグループ）、田中秀治さん（三機工業株式会社）、金井祐樹さん（同修士 2 年）には、実験室の使い方から研究におけるアドバイス、実験方法に至るまで様々なご指導いただきました。

研究室の同期である、西條拓磨君、都築敦君、中野琢磨君、藤原和也君、村上達也君には、研究室生活に留まらず、実験、講義、飲み屋で多くの時間を共にしてきました。彼らのおかげで充実した修士課程を送ることが出来たと感謝しています。このほかにも多くの先輩、友人、知人に支えられこの修士論文を書き上げる事が出来ました。

最後になりましたが、大学院進学に理解を示し、学生生活を全面的に支え続けてくれた妹と母、いまは亡き父、そして最愛の人に感謝いたします。ありがとうございました。

## 参考文献

< 英文 >

Aakra, A, Utaker J.B, Nes I.F and Bakken L.R(1999) An evaluated improvement of the extinction dilution method for isolation of ammonia-oxidizing bacteria. *J Microbiol Methods*. 39. 23-31.

Bothe, H., Jost G., Schloter M., Ward B., Witzel K.,(2000):Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments,*FEMS Microbiology Reviews*, 24, 673-690

Dalsgaard, T., Thamdrup B., Canfield D.E.,(2005):Anaerobic ammonium oxidation (Anammox) in the marine environment, *Research in Microbiology*, 156, 457-464

Freitag, T., Prosser J.,(2003):Community Structure of Ammonia-Oxidizing Bacteria within anoxic Marine Sediments, *Applied and Environmental Microbiology*, 1359-1371

George, A. Kowalchuk, J.R.Stephen, W.D.Boer, J.I.Prosser, T.M.Embley and J.W.Woldendorp(1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl.Environ.Microbiol.* 63. 1489-1497.

Giovannoni, S. J., Bristchgi, T. B., Moyer, C. L., and Field, K. G.(1990):Genetic diversity in Sargasso sea bacterioplankton, *Nature*, 345:60-63

Head, I.M., Hiorns, W.D., Embley, T.M., McCarthy, A.J., and Saunders, J.R.(1993): The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizingbacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA genesequences, *Journal of General Microbiology*,139,1147-1153

Koops, P., Purkhold U., Pommerening A., Timmermann G., Wagner M.,(2003):The Lithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacteria, In M. Dworkin et al., eds,. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community* third edition, release 3.13, March.

Kowalchuk, G.A., Stephen J.R.(2001):Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology, *Annual review of microbiology*, 55,485-529

Lane, D.J.(1993) 16S/23S rRNA Sequencing Nucleic acid techniques in bacterial systematics. 115-175

Moesender, M M., Arrieta, J M., Muyzer, G., Winter, C., and Herndl, G. J.(1999): Optimization of Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Complex Marine Bacterioplankton Communities and Comparison with Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, Applied and Environmental Microbiology, 65(8): 3518-3525

M.T Madigan, Martinko, J., Parker, J.: BROCK BIOLOGY OF MICROORGANISMS Tenth Edition, Tenth Edition, Prectice Hall

Neef, A., Amann, R., Schleifer, K.H.,(1998): Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of Planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes, 144(Pt12), 3257-66

Pommerening-Roer, A., G. Rath, and H.P. Koops(1996): Phylogenetic diversity within the genus Nitrosomonas, Systematic and Applied Microbiology, 19, 344-351

Purkhold, U., Wagner M., Timmermann G., Pommerening-Roser A., Koops H.(2003): 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 1485-1494

Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschoko, S., Jetten, M., Metzger J.W., Schleifer K.H., Wagner, M.(2000): Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation, Systematic and Applied Microbiology, 23(1), 93-106

Teske, A. E. Alm, J. M. Regan, T.S., B.E. Rittmann, and D.A. Stahl(1994) Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria, Journal of Bacteriology, 176, 6623-6630

Urakawa, H., Shinya Kurata, Taketomo Fujiwara, Daisuke Kuroiwa, Hideki Maki, Sumiko Kawabata, Takehiko Hiwatari, Haruo Ando, Toshio Kawai, Masataka Watanabe and kunio Kohata(2006) Characterization and quantification of ammonia-oxidizing bacteria in eutrophic coastal marine sediments using polyphasic molecular approaches and immunofluorescence staining. *Environmental Microbiology*. 8. 787-803.

#### <邦文>

阿部哲也(2006):有明海における脱窒活性の時空間変動, 東京大学大学院新領域創成科学研究科修士論文

岡村和麿, 田中勝久, 木元克則, 清本容子(2005):有明海奥部と諫早湾における表層堆積物中の有機物の分布と有機炭素安定同位体比, *海の研究*, 15(2), 191-200

呉海鍾(2006):干潟・浅海域の底質の現地調査に基づく環境分析に関する研究, 東京大学大学院新領域創成科学研究科博士論文

鯉淵幸生, 藤田昌史, 阿部哲也, 磯部雅彦(2005):有明海奥部の底性微生物群集構造に及ぼす物理環境の影響, *海岸工学論文集*, 第 52 卷

中村和憲(1998):環境と微生物ー環境浄化と微生物生存のメカニズムー, 産業図書株式会社

保坂信幸(2006):東京湾湾奥部における水-底泥間の栄養塩フラックス, 東京大学大学院新領域創成科学研究科修士論文

松尾友矩, 田中修三, 安田昌史, 田中和博, 長岡裕(1999),オーム社出版局

リンピヤコン タワン(2004):下水処理場における活性汚泥中のアンモニア酸化細菌群の定量化と酸化活性に及ぼす変動要因の解析, 東京大学大学院工学研究科博士論文

#### <WEB>

千葉県水産総合研究センター : <http://www.pref.chiba.jp/laboratory/fisheries/index.html>